

## Tesis de Posgrado

# Síntesis y análisis espectroscópico de pregnanesteroides : Su aplicación al estudio de la correlación estructura - actividad glucocorticoide

González, Mario Daniel

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

González, Mario Daniel. (1985). Síntesis y análisis espectroscópico de pregnanesteroides : Su aplicación al estudio de la correlación estructura - actividad glucocorticoide. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1896\\_Gonzalez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1896_Gonzalez.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

González, Mario Daniel. "Síntesis y análisis espectroscópico de pregnanesteroides : Su aplicación al estudio de la correlación estructura - actividad glucocorticoide". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1896\\_Gonzalez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1896_Gonzalez.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

tesis 1896

ej. 2

SINTESIS Y ANALISIS ESPECTROSCOPICO  
DE PREGNANESTEROIDES:  
SU APLICACION AL ESTUDIO DE LA CORRELACION  
ESTRUCTURA-ACTIVIDAD GLUCOCORTICOIDE

MARIO DANIEL GONZALEZ

1985

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

SINTESIS Y ANALISIS ESPECTROSCOPICO

DE PREGNANESTEROIDES:

SU APLICACION AL ESTUDIO DE LA CORRELACION

ESTRUCTURA-ACTIVIDAD GLUCOCORTICOIDE

Autor

Mario Daniel Gonzalez

Director de Tesis

Dr. Gerardo Burton

Lugar de trabajo

Departamento de Química Orgánica

Tesis presentada para optar al título de

Doctor en Ciencias Químicas

1985

- 1896 -

2/2

A Patricia y Gabriel  
con todo mi amor.



Agradezco a los Doctores  
Carlos F. Lantos y Gerardo Burton  
por sus enseñanzas, su preocupación  
por mi formación científica  
y por su amistad.

Agradezco especialmente:

A la Dra. A. Roldán y a la Lic. M. E. Castillo (IBYME) por sus enseñanzas y colaboración en la determinación de las propiedades biológicas de los esteroides analizados, así como por facilitarme los equipos y material necesario para dichas realizaciones.

Agradezco también:

Al CONICET por haberme otorgado, a través del Programa de Regulación Hormonal y Metabólica (PRHM; CONICET-FCEN), las becas de Iniciación y Perfeccionamiento, durante cuyo transcurso se realizó este trabajo de tesis.

A UNYMPOR (CONICET-FCEN) por el equipo técnico suministrado.

Al Lic. J. E. Rodríguez por las cromatografías líquidas de alta resolución realizadas.

Al Sr. C. G. Arabahety por los espectros RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C realizados.

Al Sr. J. A. Aznarez por la realización de los espectros de masas y cromatografías gas-líquido acopladas a espectrometría de masas.

A las Licenciadas M. R. de Aznarez y M. E. de Moglia por las cromatografías gas-líquido realizadas.

A las Señoras E. L. Maggio de Rivero y M. A. Rivero de Copes por su contribución en la parte formal de este trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Esteroides,  
Departamento de Química Biológica (FCEN) por las fructíferas  
discusiones mantenidas.

Al Lic. A. A. Ghini por su amistad y estímulo permanente.

A la Dra. L. R. Galagovsky, las Licenciadas A. S. Veleiro  
de Mc Cormack, A. Brachet Cota y E. Monteagudo, y a los compañeros  
y amigos que con su apoyo, interés y colaboración, me ayudaron a  
concretar este trabajo.

A todo el personal del Departamento de Química Orgánica,  
profesores, compañeros y no docentes; por su cordialidad y coope  
ración.

A mis padres por su apoyo a lo largo de estos años.

## INDICE

	pág.
<u>CAPITULO I: INTRODUCCION</u>	1
 <u>CAPITULO II: SINTESIS DE PREGNANESTEROIDES</u>	 21
- Síntesis de pregn-4-en-3,20-dionas.	21
. 21-hidroxilación.	23
. 21-deshidroxilación.	26
- Síntesis de pregna-1,4-dien-3,20-dionas.	28
. 21-desoxiesterooides.	34
. 21-hidroxiesterooides.	47
- Síntesis de esterooides marcados.	61
. Deuteración por intercambio isotópico	62
. Secuencia de síntesis apta para la preparación de $\Delta^1-11\beta$ -hidroxiprogesterona ( <u>10</u> ) fuertemente marcada.	69
- Síntesis de 20-metilenesterooides por reacción de Wittig.	79
- Síntesis de 20-metilenesterooides por reacción con complejos $Zn-CH_2$ .	88
. Cupla $Zn(Cu)$ .	92
. Cupla $Zn(Pb)$ .	93
- Eliminación de 3-benciltioenoléteres con níquel Raney.	96
. Reacción con níquel Raney desactivado.	100
. Reacción con W-2 níquel Raney.	104
. Hidrogenación del producto de reacción con W-2 níquel Raney.	111
. Reacciones complementarias.	114
. Mecanismo de eliminación propuesto.	117

<u>CAPITULO III: ANALISIS ESPECTROSCOPICO DE PREGNANESTEROIDES.</u>	127
- Introducción.	127
- Comparación de las características espectrales de esteroides relacionados.	134
. Espectrometría de masas.	134
. Pregnan-20-onas saturadas, mono y diinsaturadas.	141
. Pregn-1,4-dien-3,20-dionas.	154
. 20-metilenesteroides.	171
. Espectrometría de resonancia magnética nuclear de $^1\text{H}$ .	179
. Espectrometría de resonancia magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ .	198
. Pregnan-20-onas saturadas, mono y diinsaturadas.	212
. Pregn-4-en-3,20-dionas, sus 1-en-derivados y 20-metilen-análogos.	219
- Análisis conformacional de pregn-4-en-3,20-dionas y pregn-1,4-dien-3,20-dionas.	232
. Análisis conformacional en base al efecto de sustituyentes en el desplazamiento químico de los carbonos esteroideos.	232
. Efecto del solvente.	244
. Determinación de las barreras rotacionales de metilos angulares por el método de Woessner.	253
 <u>CAPITULO IV: ACTIVIDADES GLUCOCORTICOIDE DE DERIVADOS DE PROGESTERONA.</u>	 271
- Inhibición de la síntesis de ARN.	272
- Lisis celular.	284
- Mecanismo de acción de $11\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona ( <u>10</u> ).	293

. Acción inmediata.	293
. No perdurabilidad del efecto en ausencia del esteroide.	300
. Acción de la Actinomicina D.	306
 <u>CAPITULO V: CORRELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.</u>	 314
 <u>CAPITULO VI: PARTE EXPERIMENTAL.</u>	 328
- Generalidades.	328
- Síntesis de pregnanesteroides.	333
- Estudios sobre la reacción de 3-benciltioenoléteres con níquel Raney.	362
- Medición de los tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ) y efecto nuclear Overhauser (enO) de los $^{13}\text{C}$ de desoxicorticosterona ( <u>4</u> ) y corticosterona ( <u>5</u> ).	367
- Actividad biológica.	371
 RESUMEN.	 379
 BIBLIOGRAFIA.	 387

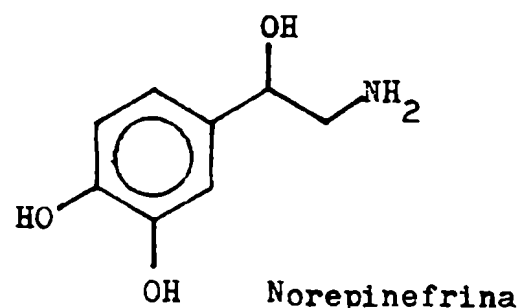
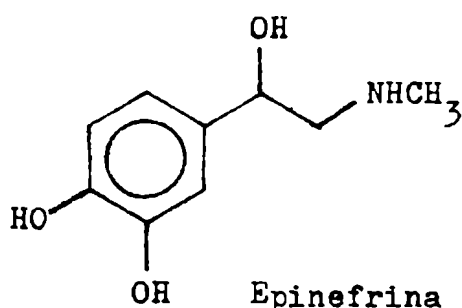
## CAPITULO I

### INTRODUCCION

## INTRODUCCION

La glándula suprarrenal o adrenal se encuentra formada en mamíferos por dos porciones de origen embrionario y secreción hormonal distintos:

La médula suprarrenal deriva del sistema nervioso autónomo simpático. Las hormonas sintetizadas por la misma son la epinefrina (adrenalina) y la norepinefrina (noradrenalina).



La epinefrina es principalmente sintetizada y almacenada en la médula adrenal, actuando a través de la circulación sobre órganos distantes. Esta hormona es necesaria para proporcionar una respuesta funcional rápida a urgencias tales como el frío, la fatiga, etc. En ese sentido, contribuye al mecanismo que ha sido llamado de "pelea o huida" <sup>1a</sup>, resultante de la acción conjunta de la médula suprarrenal y del sistema nervioso simpático. La hormona produce la degradación del glucógeno y gluconeogénesis, aumentan-



do así la glucemia, es decir la disponibilidad inmediata de energía a través de la oxidación de glucosa.

La corteza suprarrenal posee el mismo origen embrionario que otras glándulas como testículo y ovario , migrando luego cada una a su localización final. Por lo tanto todas guardan ciertas similitudes. La corteza produce un número de potentes hormonas, todas las cuales corresponden a derivados esteroidales. Las hormonas gonadales también son esteroides, no muy diferentes a los correspondientes a la corteza suprarrenal <sup>1b</sup>.

Las hormonas esteroidales de la corteza suprarrenal pueden clasificarse en cuatro grupos generales, cada uno con funciones características:

- Glucocorticoides: afectan primordialmente el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos.
- Mineralocorticoides: influyen primariamente sobre el transporte de electrolitos y la distribución de agua <sup>2</sup>.
- Esteroides que regulan preferentemente el equilibrio ácido-base: promueven la eliminación urinaria de protones o de aceptores de protones.
- Andrógenos: afectan principalmente las características sexuales en los órganos específicos que les sirven de blanco. Estos compuestos son producidos en mayor proporción por el testículo.

La presente tesis se refiere a algunos aspectos del primer grupo de esteroides en un intento de correlacionar la estructura esteroideal con su función. En la misma se trabajó primordialmente con las dos series de esteroides indicadas en la figura 1.

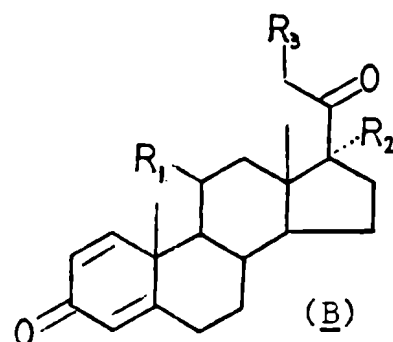
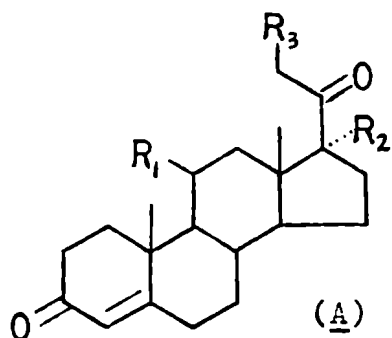
El principal glucocorticoide en el hombre es el cortisol (8) mientras que en la rata lo es la corticosterona (6) (ver estructuras correspondientes en figura 1).

El término glucocorticoide se originó al comprobarse que estas hormonas regulan el metabolismo de hidratos de carbono <sup>3</sup>, aunque con posterioridad se determinó que muchas de sus funciones no estaban relacionadas con los azúcares.

Respecto de la primera función, los glucocorticoides producen un profundo efecto en el metabolismo de glucosa (hiperglucemia y deposición de glucógeno en hígado) mediante un complejo mecanismo, actuando en diversos tejidos del organismo <sup>4</sup>. En el hígado los glucocorticoides promueven la captación de aminoácidos, inducen la síntesis de enzimas que convierten a dichos aminoácidos en  $\alpha$ -cetoácidos precursores de glucosa (aminotransferasas) así como la síntesis de enzimas-clave de la gluconeogénesis (piruvatocarbóxilasa, fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa, glucosa-6-fosfatasa) y activan la de la gluconeogénesis (glucógenosintetasa). Esto produce la deposición de glucógeno en hígado y el aumento de glucosa liberada a la sangre. Este efecto, asociado a la inhibición de la captación periférica de glucosa (acción antiinsulínica), causa la hiperglucemia observada.

En riñón los glucocorticoides probablemente sean también gluconeogénicos, activando además la síntesis de amoníaco a partir

**Figura 1:** Estructuras y nombres IUPAC de los principales esteroides estudiados.



	Nombre	Base	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1	Pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	H	H	H
2	11 $\beta$ -hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	OH	H	H
3	17 $\alpha$ -hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	H	OH	H
4	21-hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	H	H	OH
5	11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	OH	OH	H
6	11 $\beta$ ,21-dihidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	OH	H	OH
7	17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	H	OH	OH
8	11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	OH	OH	OH
9	Pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>E</u>	H	H	H
10	11 $\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>E</u>	OH	H	H
11	17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>E</u>	H	OH	H
12	21-hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>E</u>	H	H	OH
13	11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>E</u>	OH	OH	H
14	11 $\beta$ ,21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>E</u>	OH	H	OH
15	17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>E</u>	H	OH	OH
16	11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>E</u>	OH	OH	OH

de glutamina y la filtración glomerular.

En las células adiposas, linfoides, conectivas, de piel, musculares y óseas los glucocorticoides promueven la destrucción de proteínas y/o grasas, liberando a la sangre aminoácidos, glicerol y ácidos grasos. Los dos primeros son captados por hígado y riñón y convertidos en glucosa (gluconeogénesis), mientras que los ácidos grasos actúan como fuente de energía para el hígado.

La tabla I-1 enumera los numerosos efectos de los glucocorticoides sin abrir juicio acerca de si estos están interrelacionados o no.

En cuanto a su acción farmacológica, los glucocorticoides fueron utilizados en numerosas condiciones clínicas que van desde el síndrome de Addison (deficiencia de glucocorticoides), pasando por diversos cuadros inflamatorios hasta ciertas leucemias (una detallada enumeración de las aplicaciones clínicas de los glucocorticoides se encuentra descripta en referencia 4).

Todo este complejo cuadro de efectos biológicos y farmacológicos de los glucocorticoides crea dudas acerca del criterio a elegir para medir la potencia de una molécula supuestamente glucocorticoide y por ende, dudas acerca del método más adecuado para estudiar correlaciones estructura-función. Obviamente sería poco práctico determinar todos los parámetros posibles de la función corticoidea.

El problema se complica aún más si se tienen en cuenta las ideas modernas acerca de los mecanismos de acción de una hormona esteroidea<sup>5</sup>. Lo que hasta hace relativamente poco fue consi-

Tabla I-1: Efectos de los glucocorticoides.

- Aumento de la deposición de glucógeno en hígado.
- Estimulación de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos en hígado.
- Aumento de la captación hepática de aminoácidos circulantes.
- Inducción de aminotransferasas hepáticas.
- Incremento de la biosíntesis de proteínas en hígado.
- Inhibición de la captación de glucosa por las células periféricas.
- Disminución del metabolismo proteico en músculo, hueso, tejido linfoide.
- Menor lipogénesis en el tejido adiposo.
- Estimulación de la lipólisis en el tejido adiposo.
- Aumento en la formación de cuerpos cetónicos.
- Incremento de la filtración glomerular.
- Aumento de la secreción estomacal (HCl y pepsina).
- Estimulación del crecimiento y maduración del pulmón fetal.
- Estimulación de la eritropoyesis y leucopoyesis.
- Disminución en el número de eosinófilos, basófilos y linfocitos de la sangre.
- Inhibición del crecimiento del tejido linfático normal (timo, ganglio, bazo) y patológico (linfomas).
- Disminución de la matriz ósea (osteoporosis).
- Mayor resistencia al estrés.
- Menor respuesta inmunitaria (disminución de anticuerpos).
- Inhibición de la respuesta antiinflamatoria y antialérgica.

derado el dogma del mecanismo de acción de las hormonas esteroideas (unión a un receptor citosólico específico---->traslocación al núcleo---->expresión genómica---->efecto) es cuestionado actualmente, sobre todo en cuanto a la universalidad de la mediación genómica. Es así como el efecto de muchas moléculas pequeñas podría explicarse por una acción a nivel de membrana celular. En esta tesis se consideró la posibilidad de ambos tipos de mecanismo.

Finalmente resta considerar el concepto cuantitativo de "potencia", el cual en general se ha asociado a "sensibilidad" o sea la menor dosis que produce un efecto detectable. En la presente tesis se considera en forma paralela al anterior un nuevo concepto, correspondiente a "respuesta máxima cualquiera sea la concentración a la que ésta se produce". Todos estos conceptos serán analizados en mayor detalle en el capítulo IV de esta tesis.

Dentro de los órganos linfáticos sensibles a los glucocorticoides indicados en la tabla I-1 (pág. 6) se destaca el timo. Esta es una glándula bilobular que tiende a decrecer con la edad, a pesar de lo cual cumple un papel fundamental en el establecimiento del sistema inmune. En el timo maduran algunos linfocitos provenientes de la médula, transformándose en linfocitos T, responsables de la inmunidad celular <sup>6</sup>.

Los timocitos presentan la ventaja de su fácil aislamiento y su sensible respuesta a los glucocorticoides clásicos. Por estas razones es que se eligió el timo como órgano blanco.

Los glucocorticoides ejercen distintos efectos sobre los timocitos, los cuales se resumen en la tabla I-2. Aquí tampoco se

abre juicio acerca de su posible interrelación.

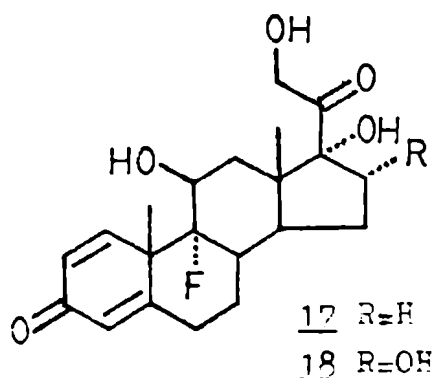
Tabla I-2: Efectos de los glucocorticoides sobre los timocitos <sup>7</sup>.

- Disminución de la captación y transporte de glucosa y otras hexosas.
- Disminución de la incorporación de precursores a ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN).
- Inhibición de la síntesis de proteínas.
- Disminución de la actividad de ARNpolimerasa.
- Disminución del contenido de ATP.
- Alteración del metabolismo de ácidos grasos.
- Disminución de la viabilidad celular (número de células vivas determinado por exclusión de azul tripán).
- Aumento de la lisis celular (disminución del número de células enteras, vivas o muertas).
- Disminución del peso del timo.

Dentro de este amplio espectro de efectos se eligió la inhibición de la incorporación de precursores (<sup>3</sup>H-uridina) en ARN y la disminución de la viabilidad celular. La utilización de estos parámetros no significa que los demás efectos puedan correlacionarse necesariamente en forma lineal con los elegidos, ni que puedan aplicarse a ellos los resultados de relación estructura-función obtenidos.

Existen numerosos trabajos publicados acerca del mecanismo molecular a través del cual se producen los efectos glucocorticoides, tanto en células normales (timocitos, linfocitos, tejido conectivo) como malignas (linfomas, hepatomas, linfocitos leucémicos) <sup>7,8</sup>. El mecanismo de acción glucocorticoide considerado en la actualidad como "clásico" será discutido en la sección IV.3 (pág. 293) donde se describe el estudio realizado acerca del mecanismo de acción de 11 $\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10) en comparación con el del glucocorticoide natural corticosterona (6), el cual ejerce su acción a través del mecanismo clásico (ver estructuras correspondientes en figura 1, pág. 4).

A pesar de todos esos trabajos, todas las líneas de investigación anteriormente mencionadas emplearon una pequeña variedad de esteroides. Los compuestos generalmente utilizados son los glucocorticoides naturales (6) y (8) (figura 1, pág. 4) y algunas potentes drogas artificiales como dexametasona (17) y triamcinolona (18).





También se han ensayado esteroides de menor potencia glucocorticoide, como por ejemplo 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (2) y el mineralocorticoide 11-desoxicorticosterona (4)(figura 1, pág. 4) "per se" o en conjunción con glucocorticoides (como agonistas o antagonistas)(ver por ejemplo referencia 9).

En ninguno de los trabajos mencionados se realizó una correlación sistemática entre las características estructurales y biológicas de las moléculas glucocorticoideas, pese a la importancia farmacológica de obtener esteroides más potentes y específicos.

Los primeros intentos en este sentido fueron desarrollados por los grupos de Hansch y Fujita <sup>10</sup> y de Free y Wilson <sup>11</sup> hacia 1964.

El primer grupo intentó correlacionar la actividad biológica con el carácter lipofílico del esteroide. Como medida de este último parámetro utilizaron el coeficiente de partición entre octanol y agua <sup>10</sup>. En cambio Free y Wilson adjudicaron una contribución a cada sustituyente y al esqueleto base, obteniéndose la actividad calculada por suma de dichas contribuciones <sup>11</sup>:

$$\log 1/C = \mu + \sum_{i=1}^n a_i x_i$$

siendo: C = concentración que produce un determinado efecto.

$\mu$  = contribución del esqueleto base.

n = número de sustituyentes.

$a_i$  = efecto de iésimo sustituyente.

$x_i$  = 1 si el sustituyente se encuentra presente.

$x_i = 0$  si el sustituyente no está presente.

Este último método permite calcular la actividad de un esteroide sin necesidad de poseer el mismo (solo se requiere disponer de los parámetros  $\mu$  y  $a_i$ ), mientras que el anterior requiere de cada esteroide para poder determinar sus características físicoquímicas y, con ellas, predecir su actividad.

La ventaja del segundo método discutido se ve superada por el considerable error del mismo. El principal origen de éste, proviene de considerar que el efecto de cada sustituyente es independiente de las otras funcionalidades presentes en el esteroide, sobresimplificando el problema ya que los sustituyentes pueden interactuar directa o indirectamente entre sí, alterando el efecto individual de los mismos.

Trabajos más recientes sobre correlación estructura-actividad intentaron analizar la primera variable del problema en forma más integral. De allí surgieron algunos trabajos basados en datos estructurales globales, obtenidos por difracción de rayos X, cálculos teóricos de conformaciones más estables y algunos ejemplos aislados que utilizaron la resonancia magnética nuclear, los cuales se discutirán someramente en la presente introducción.

Duax y colaboradores <sup>12</sup>, tras analizar los datos cristalográficos de unos 400 esteroides, concluyeron que los detalles conformacionales observados eran controlados intramolecularmente y que la influencia de las fuerzas debidas al empaquetamiento cristalino eran despreciables.

Weeks, Duax y Wolff <sup>13</sup>, apasionados investigadores de la

relación estructura-actividad, estudiaron los posibles factores estructurales debidos a la halogenación en posición  $9\alpha$  que resultaban en un aumento notable de la actividad antiinflamatoria del cortisol (8). El análisis por difracción de rayos X del  $9\alpha$ -fluorocortisol (19) indicó una mayor torsión del anillo A de este esteroide hacia la cara  $\alpha$  respecto de 8. Esto podría deberse a una interacción  $F9\alpha-H1\alpha$  que produce la rotación a lo largo de la unión  $C1-C10$  y, por compensación interna, altera toda la conformación del anillo A, lo que se traduce en su flexión hacia la cara  $\alpha$  del esteroide (figura 2).

Los autores asociaron este hecho con la flexión del anillo A hacia la cara  $\alpha$  del esteroide en presencia de un doble enlace 1,2 la cual también produce un notable aumento en el efecto antiinflamatorio de 8 <sup>13</sup>.

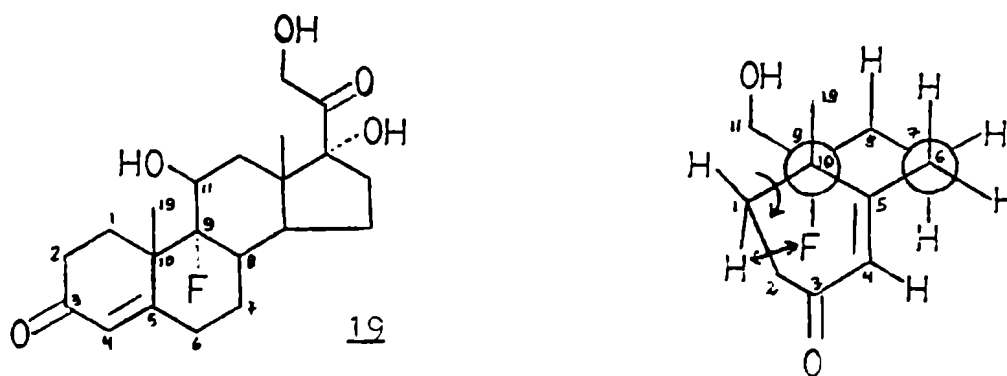


Figura 2: Efecto de la introducción de un  $9\alpha$ -flúor en la conformación del cortisol (8).

En cambio la funcionalización en posición  $6\alpha$  con un átomo de flúor, produce una menor flexión del anillo A y, concomitantemente, solo aumenta levemente la actividad antiinflamatoria. Estas alteraciones no afectan la conformación de la cadena lateral.

Por lo tanto el aumento en la actividad antiinflamatoria estaría relacionado con la curvatura del esteroide.

Lamentablemente este trabajo utilizó como parámetro biológico la acción antiinflamatoria, la cual no resulta el más conveniente debido a que contribuyen a la misma varios procesos, no totalmente estudiados.

Existen, además, reservas (ver más adelante) sobre la utilización de datos conformacionales obtenidos por difracción de rayos X, ya que las fuerzas intermoleculares en el cristal no serían despreciables <sup>14</sup>.

Schmit y Rousseau presentaron en una serie de publicaciones una discusión acerca de los requerimientos para un estudio sobre correlación estructura-actividad. Primero indicaron la necesidad de poseer datos acerca de la actividad biológica de una serie de esteroides, lo más amplia posible <sup>15</sup>. Los autores trabajaron con cultivos de células de hepatoma de rata, determinando tanto la afinidad de los esteroides por el receptor de glucocorticoides, como la inducción de la enzima tirosina aminotransferasa.

En trabajos posteriores, Schmit y Rousseau demostraron la factibilidad de aplicar el cálculo teórico de la conformación más probable, por optimización de la estructura de menor energía, al caso de los esteroides <sup>16,17</sup>. Finalmente los autores discutieron como se veía afectada la conformación esteroideal (curvatura de

los anillos A y D, torsión del esteroide, conformación de la cadena lateral) por la presencia de distintas combinaciones de sustituyentes <sup>14,18</sup>, a diferencia de Free y Wilson que consideraron los sustituyentes individualmente <sup>11</sup>.

La curvatura del esteroide, así como su torsión, se presentan como parámetros atractivos de comparación con la actividad biológica correspondiente, dado que afectan la disposición espacial relativa de grupos característicos (por ejemplo los carbonilos de posiciones 3 y 20 del esteroide). Schmit y Rousseau propusieron también como parámetros interesantes el área superficial y el volumen esteroidal, de importancia si se tiene en cuenta la posibilidad de fuerzas hidrofóbicas entre la hormona y el receptor, y el tamaño limitado del sitio receptor <sup>14,18</sup>.

Lamentablemente, el trabajo de estos investigadores culminó allí, no llegando a correlacionar las actividades biológicas determinadas y los parámetros estructurales calculados.

Cabe destacar las diferencias observadas en varios casos entre las conformaciones calculadas y aquellas determinadas por difracción de rayos X, especialmente en la conformación del anillo A (posiblemente debido a fuerzas intermoleculares, dada la cercanía entre moléculas en el cristal) <sup>14</sup>.

Wolff y colaboradores <sup>19,20</sup> en la misma época de los trabajos anteriores, también consideraron de suma importancia el área superficial y la conformación del anillo A. La afinidad por el receptor (no analizaron ningún efecto posterior en el metabolismo de los cultivos de células de hepatoma de rata con que trabajaron) se vería afectada también, en forma positiva o negativa, por la presen

cia de grupos polares en distintas posiciones del esteroide, y por el tamaño del sustituyente sobre C9. Además indicaron que la presencia de grupos carbonilos en las posiciones 3 y 20 serían imprescindibles. Este hecho está de acuerdo con trabajos realizados por el mismo Wolff <sup>21</sup> en 1966, donde se reemplazaron los carbonilos por grupos metileno o gem-ciclopropano en la molécula del cortisol (8), desapareciendo su potente actividad biológica.

La ecuación propuesta por Wolff y colaboradores <sup>19</sup> para el cálculo de la constante de disociación del complejo hormona-receptor ( $K_D$ ) es la siguiente:

$$\text{Log } K_D = - 0,022 (\text{AS}) - 0,59 (\text{P}) + 1,50 (\text{incl}) + 6,10 (\text{X}) - 6,52$$

donde (AS) es el área superficial (expresado en Å<sup>2</sup>).

(P) interacción de grupos polares con el receptor:

+1 para 11β ó 21-hidroxiesteroides.

-1 para 16α, 16β ó 17α-hidroxiesteroides.

-2 para 11-cetoderivados (doble acción negativa por alteración conformacional y polaridad no deseada).

(incl) conformación del anillo A (expresado por la distancia C3-C17 en Å).

(X) limitación de tamaño del sustituyente en C9.

Raynaud y colaboradores <sup>22</sup> determinaron la afinidad de más de 100 esteroides por los receptores de estrógenos, progestágenos, andrógenos, mineralocorticoides y glucocorticoides.

Estos investigadores dividieron los sustituyentes en dos grupos:

- Grupos funcionales en cuya ausencia no se produce unión al receptor o solo se produce unión en proporción limitada.
- Grupos moduladores, los cuales solo influyen en la habilidad de los otros grupos de interactuar con el receptor creando un entorno favorable o desfavorable.

Destacaron la importancia de un estudio tridimensional acerca de la forma y tamaño del esteroide y de la accesibilidad de los grupos funcionales esenciales.

Partiendo de la molécula del  $9\alpha$ -fluorocortisol (19) determinaron que la introducción de un doble enlace 1,2 mantiene o aumenta la unión al receptor, mientras que la eliminación del hidroxilo-21 produce el efecto contrario. Un metilo en posición 16 ( $\alpha$  o  $\beta$ ) produce mayor unión al receptor mientras que si el sustituyente es un hidroxilo la unión es menor.

Pese al detallado estudio realizado en cuanto a la influencia de distintos sustituyentes, Raynaud y colaboradores <sup>22</sup> no llegaron a ninguna conclusión global acerca de cual es la causa de las alteraciones en la unión al receptor.

El mismo Raynaud indicó con posterioridad <sup>23</sup> la extrema rigidez asignada a los esteroides en los trabajos anteriores donde la conformación esteroideal (obtenida por minimización de energía interna o por difracción de rayos X) se tomaba como tal sin

considerar la posibilidad de movilidad, en mayor o menor medida, de distintas regiones del esteroide.

Raynaud <sup>23</sup> nuevamente analizó la unión a distintos receptores (estrógenos, andrógenos, mineralocorticoides y glucocorticoides) determinando que la introducción de insaturaciones en posiciones 9 y 11 de  $\Delta^4$ -3-ceto-19-nor-esteroides favorecen la afinidad por todos los receptores (salvo el de estrógenos al cual no se unen ninguno de los esteroides analizados), disminuyendo por lo tanto la especificidad de los compuestos. Esto estaría relacionado con la mayor flexibilidad que las insaturaciones mencionadas le confieren al esqueleto esteroidal, permitiendo su adaptación al receptor.

La energía requerida para dicha distorsión sería suministrada por la misma unión al receptor. En ningún momento se mencionó algo acerca del efecto posterior producido por la unión, es decir, si los esteroides analizados eran efectores, agonistas o antagonistas.

La resonancia magnética nuclear también fue empleada, aunque en menor proporción, en la obtención de datos estructurales para su posterior correlación con la actividad glucocorticoide.

Giannini y colaboradores <sup>24</sup> realizaron un estudio conformacional-electrónico por resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  de derivados del cortisol (8) sustituidos en posición  $9\alpha$ , comparándolo con trabajos anteriores de difracción de rayos X <sup>13</sup> y cálculos teóricos <sup>25</sup>. Lamentablemente estos estudios se basaron en teorías acerca del desplazamiento químico ya superadas <sup>26</sup> donde el efecto



se asignaba a una interacción 1,3-diaxial entre el hidrógeno del carbono observado y el sustituyente ubicado sobre el carbono  $\beta$  respecto del anterior.

Según esta teoría la ubicación de un sustituyente en C9 afectaría el desplazamiento químico de los carbonos 1, 7, 12 y 14 (todos presentan un hidrógeno axial hacia la cara  $\alpha$ ), en mayor proporción cuanto mayor sea el grupo introducido. Sin embargo Giannini y colaboradores observaron un mayor efecto en el caso del 9 $\alpha$ -flurocortisol (19) que en el 9 $\alpha$ -bromo derivado. Los autores no pudieron explicar estas anomalías, destacando lo inadecuada que resultó la teoría utilizada. Por lo tanto tampoco pudieron inferir conclusiones estructurales ni su importancia en la acción biológica.

En cambio Genard <sup>27</sup>, trabajando con derivados del 9 $\alpha$ -flurocortisol (19), sugirió que la presencia del fuerte dipolo C9-F modificaría la polarización de las uniones C-H axial en C1, C7, C12 y C14. Dichos cambios (además de afectar el desplazamiento químico de los carbonos) podrían ser los causantes de la perturbación de las débiles interacciones entre el esteroide y el receptor, afectando la afinidad.

Sin embargo las modificaciones en el desplazamiento químico observadas admiten otra explicación a la luz de la teoría moderna del desplazamiento químico <sup>28</sup>. En ese caso el efecto observado se debería, en parte, a la desaparición de una interacción H-H 1,3-diaxial y no a la aparición de una interacción H-X 1,3-diaxial, siendo entonces independiente de X. Además se produciría un pequeño efecto inductivo. Por lo tanto el efecto inductivo sería menor que el indicado por Genard. Es más, cualquier factor que

alterara la conformación esteroideal y alterara la coplanaridad de los sistemas H-H 1,3-diaxial, también modificaría el desplazamiento químico. Es decir que los corrimientos observados pueden ser indicativos de alteraciones conformacionales y no de alteraciones de la polarización de uniones H-C (para una detallada descripción de la teoría moderna del desplazamiento químico ver capítulo III, pág. 198).

Como se desprende de la presente discusión, el panorama acerca de la relación estructura-actividad glucocorticoide dista mucho de ser claro y concluyente.

La presente tesis intenta aportar un grano de arena más al conocimiento de los requerimientos estructurales para la acción glucocorticoide.

Como método de "observación" de la estructura esteroideal se eligió la resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ . Esta presenta como ventaja que aporta información acerca del esteroide en solución, es decir, en condiciones más aproximadas a las del ámbito de interacción esteroide-receptor que la difracción de rayos X (estado sólido) o la minimización de energía interna (moléculas libres de interacciones intermoleculares).

En cuanto a la actividad glucocorticoide se eligió como órgano blanco, como se mencionara anteriormente, el timo, analizando la inhibición en la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN y la disminución de la viabilidad celular.

Para lograr el objetivo planteado fue necesaria la síntesis de derivados esteroidales, su análisis estructural por resonancia magnética nuclear y la determinación de la actividad biológica.

Se sintetizaron además otros esteroides modelo que facilitaron la interpretación de los resultados obtenidos.

Finalmente, la posesión de diversas series de esteroides, permitieron llevar a cabo estudios comparativos de sus características espectroscópicas (espectrometría de masa, resonancia magnética nuclear protónica y de  $^{13}\text{C}$ ) como un aporte más a esta rama del conocimiento.

CAPITULO II  
SINTESIS DE  
PREGNANESTEROIDES

## SINTESIS DE PREGNANESTEROIDES

### II.1. Síntesis de pregn-4-en-3,20-dionas:

#### GENERALIDADES:

Para el estudio de la relación entre estructura esteroi-  
dal y actividad glucocorticoide, se decidió, como se mencionara  
anteriormente, analizar el efecto en la acción glucocorticoide de  
los hidroxilos  $11\beta$ ,  $17\alpha$  y 21 sobre el esqueleto esteroideal corres-  
pondiente a pregn-4-en-3,20-diona (1), y la modificación de dicha  
acción debida a la introducción de un doble enlace en posición 1,2  
( $\Delta^1$ ) de dichos compuestos (ver estructuras en la figura 1, pág. 4).

Originalmente se disponía de todos los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroi-  
des de la serie. Sin embargo luego, a falta de algunos de ellos,  
se decidió sintetizarlos, por razones de tiempo (demoras en las  
importaciones) y económicas (tabla II-1, pág. 27) <sup>29</sup>.

Es así que se sintetizaron  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2),  
 $11$ -desoxicorticosterona (4),  $21$ -desoxicortisol (5) y cortexolona  
(7) a partir de corticosterona (6), progesterona (1), cortisol (8)  
y  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) respectivamente. Estos cuatro este-  
roides sintetizados se obtuvieron por dos tipos de reacciones, am-  
bas relacionadas con la posición 21 de los mismos.

Se encuentra descripta en literatura la síntesis de los  
 $21$ -hidroxiesteroides 4 <sup>30</sup> y 7 <sup>31</sup> a partir de 1 y 3 respectivamente,  
mediante la reacción de iodación de Stork en C21 <sup>32</sup>. La reacción,

realizada a baja temperatura (10°C) en combinación con la base débil elegida (CaO), permite introducir un solo átomo de yodo en el metilo-21 de la cadena lateral del esteroide.

Para el segundo paso de la reacción (transformación de la  $\alpha$ -iodocetona en el  $\alpha$ -acetato correspondiente) existen distintas técnicas consistentes en la disolución del esteroide en acetona y tratamiento con distintos acetatos en distintas condiciones, como por ejemplo acetato de potasio o de sodio <sup>33</sup>, acetato de potasio/ácido acético <sup>30</sup> ó ácido acético/trietilamina <sup>31</sup>.

Finalmente para la hidrólisis de los 21-acetatos se eligieron las condiciones básicas sumamente controladas (NaOH en metanol/agua 5' bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente).

En el caso de la síntesis de los 21-desoxiesteroideos se encuentra descrita en literatura la formación de  $\Delta^1$ -21-desoxicortisol (13) a partir de  $\Delta^1$ -cortisol (16) <sup>34</sup> (ver estructuras en la figura 1, pág. 4). Para ello se transformó el 21-hidroxiesteroide en el mesilato correspondiente, mejor grupo saliente, el cual fue reemplazado por un átomo de yodo por tratamiento con INa en etanol. Finalmente el 21-iododerivado fue hidrogenado (Pd como catalizador en etanol) obteniéndose el  $\Delta^1$ -21-desoxicortisol.

Otros investigadores <sup>35</sup> realizaron la eliminación del grupo 21-mesitilo en esteroides 17-esterificados, por tratamiento con INa en ácido acético.

## RESULTADOS Y DISCUSION:

## II.1.1. 21-hidroxilación:

La iodación de Stork de progesterona (1) y su 17 $\alpha$ -hidroxiderivado (3) produjo los 21-iodoesteroides 20 y 21 correspondientes (figura 3). Dada la poca estabilidad de las  $\alpha$ -iodocetonas formadas fue necesario realizar el aislamiento y transformación de las mismas en el menor tiempo posible.

Para agilizar la aislación se reemplazó el método utilizado por Stork (volcar en  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , filtrar y secar) <sup>32</sup>, adoptándose la técnica descripta por Rothman y colaboradores (diluir con éter, lavar con solución acuosa de  $\text{I}_2$ , secar con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y evaporar el solvente) <sup>31</sup> porque se obtuvo así el esteroide ya seco, mientras que en el primer caso se debía eliminar el agua, lo cual solo sería viable por disolución en un solvente adecuado, posterior secado con algún desecante y evaporación del solvente. No es posible eliminar el agua utilizando vacío, pues en esas condiciones se favorece la descomposición del iodoesteroide debido a la volatilización del  $\text{I}_2$  liberado.

Para la transformación de las  $\alpha$ -iodocetonas en los acetatos correspondientes se eligió la técnica que utiliza como reactivo ácido acético/trietilamina <sup>31</sup> ya que esta reacción que transcurre en fase homogénea, requiere menos tiempo (45' frente a 4-16 hs), de suma importancia trabajando con compuestos de fácil descomposición.

Cuando se partió de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) se obtu

vo así el 21-acetoxi-17 $\alpha$ -hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona (22), el cual fue hidrolizado en medio básico en condiciones muy controladas <sup>33</sup>, como se indicara anteriormente, debido a la inestabilidad del sistema 17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-20-ceto tanto en medio básico <sup>36</sup> como ácido <sup>37</sup>.

En cambio el producto del calentamiento a reflujo de 21-iodoprogesterona (20) con ácido acético/trietilamina en acetona, no pudo ser hidrolizado en las condiciones anteriores. Sin embargo, cuando dicho producto se procesó según la técnica original de Stork <sup>32</sup> (calentamiento a reflujo con NaHSO<sub>3</sub> en metanol/agua) la hidrólisis posterior se logró fácilmente, obteniéndose el producto esperado 4. Según Stork y colaboradores <sup>32</sup> este procedimiento se realizaba simplemente para eliminar el I<sub>2</sub> que se libera durante la sustitución por acetato. Sin embargo, la acción del NaHSO<sub>3</sub> en este paso de síntesis iría más allá de simplemente eso dado que antes de ese paso el esteroide no pudo ser hidrolizado mientras que después del mismo sí.

Otro hecho interesante observado sobre esta secuencia de reacciones fue que cuando se intentó sintetizar 21-hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (23) a partir de 5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (24) en iguales condiciones de síntesis que en la obtención de 11-desoxicorticosterona (4) a partir de progesterona (1), se recuperó cuantitativamente el esteroide de partida en forma intacta. Este hecho, sobre el cual no se profundizó mayormente, sugeriría cierta influencia del sistema  $\Delta^4$ -3-ceto en el desarrollo de la reacción. En general la reacción de Stork fue realizada sobre esteroides que poseían esos sustituyentes en el anillo A; Bodor y colaboradores <sup>30</sup> analizaron el



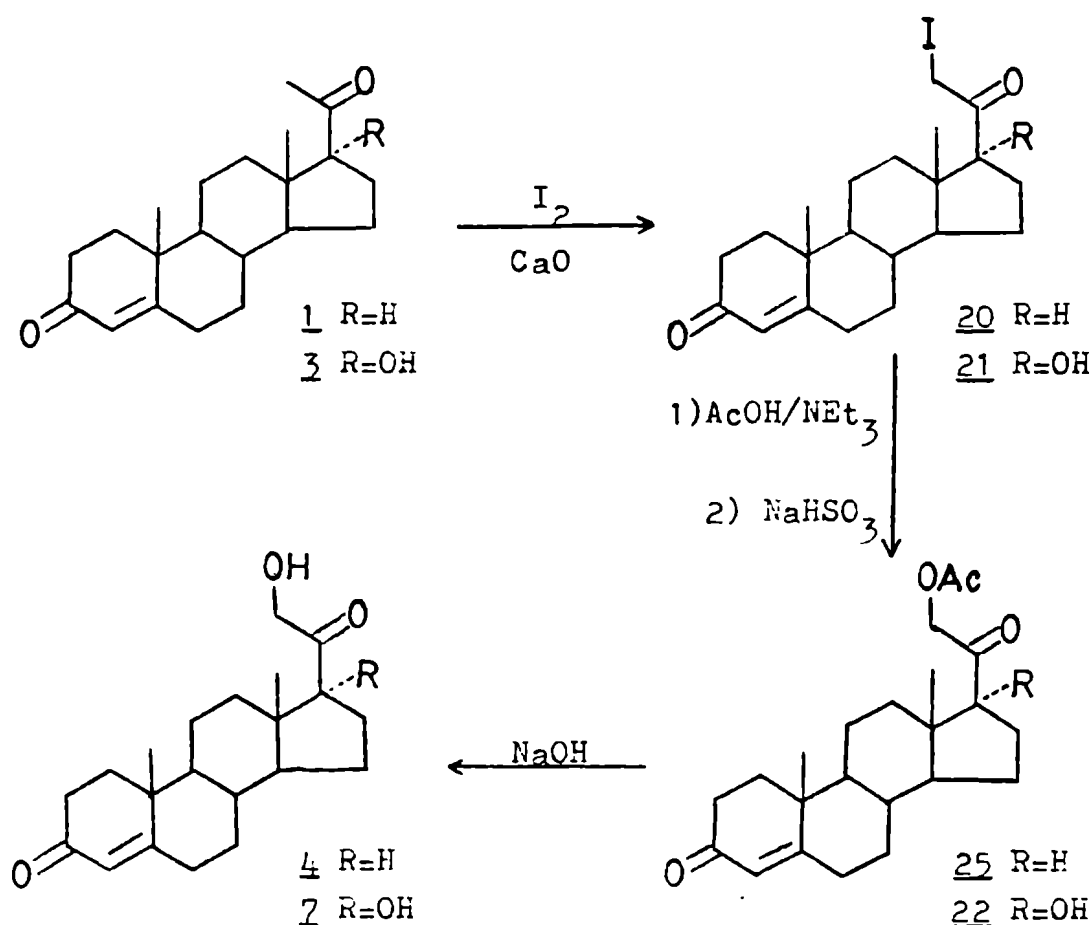
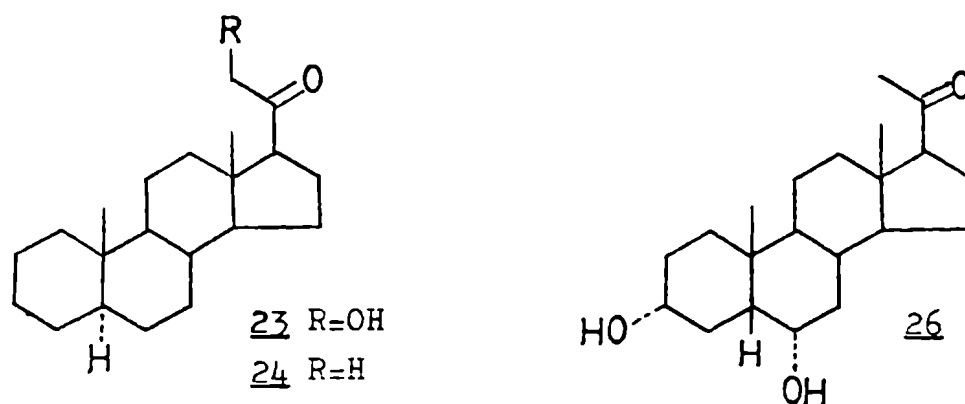


Figura 3: Síntesis de 21-hidroxiesteroides a partir de los 21-deso xicompuestos correspondientes.

caso de  $3\alpha,6\alpha$ -dihidroxi- $5\beta$ -pregnan-20-ona (26) obteniendo una cur va polarográfica similar a la de progesterona (1) durante la ioda ción, pero con un rendimiento final del 21-acetato bastante bajo (17 % frente al 55 % de rendimiento que se obtuvo en el caso de 1).

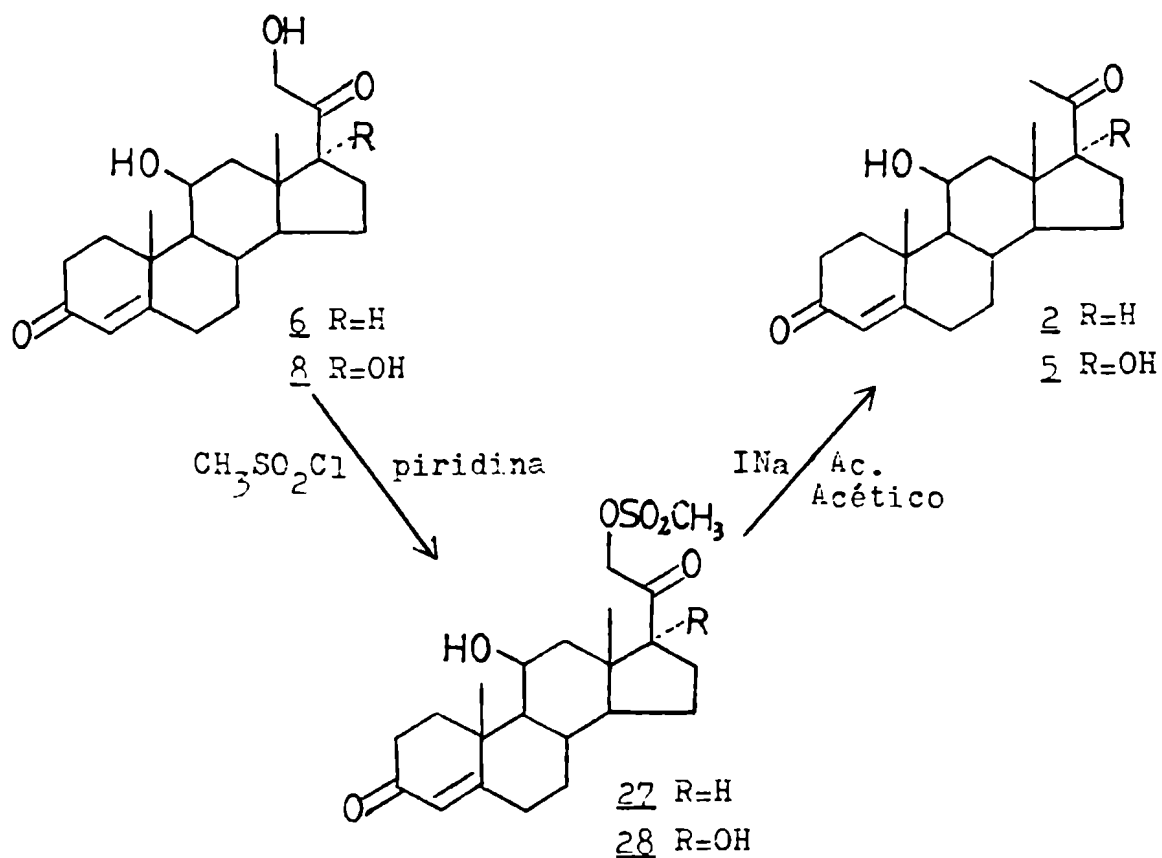
Los resultados obtenidos en las reacciones de 21-hidroxi lación se resumen en la tabla II-1 (pág. 27).



#### II.1.2. 21-deshidroxilación:

Para la obtención de 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (2) y su 17 $\alpha$ -hidroxiderivado (5) a partir de corticosterona (6) y cortisol (8) respectivamente, se prepararon los 21-mesitil derivados correspondientes 27 y 28 (figura 4) con cloruro de metanosulfonilo en piridina a 0°C <sup>33</sup>. De este modo la reacción procedió en forma específica para el hidroxilo primario, sin que se afectaran los hidroxilos terciarios (17 $\alpha$  en 8) o secundarios (11 $\beta$  en 6 y 8).

Para el segundo paso de la reacción (eliminación del mesilato) se eligió el desplazamiento con INa en ácido acético <sup>35</sup>. Con la técnica usada se evitó trabajar con 21-iododerivados, de poca estabilidad, y no fue necesaria la hidrogenación, la cual exige un cuidadoso control (consumo de dos moles de hidrógeno) para evitar la reducción del sistema  $\Delta^4$ -3-ceto.



**Figura 4:** Síntesis de 21-desoxiesteroides a partir de los 21-hidroxiderivados correspondientes.

**Tabla II-1:** Síntesis de 21-hidroxi y 21-desoxiesteroides.

M. prima	Reacción	Producto	Rend.%(a)	Costos(b)
1	hidroxilación	4	55 %	6,20/3,00
3	hidroxilación	2	57 %	6,25/3,65
6	deshidroxilación	2	84 %	375/19
8	deshidroxilación	5	71 %	240/4,90

(a) Producto luego de purificar.

(b) costo del producto/costo de la materia prima <sup>29</sup>.

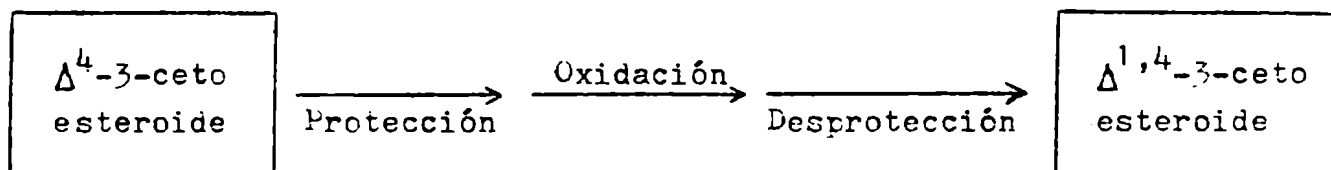
## II.2. Síntesis de pregna-1,4-dièn-3,20-dionas.

### GENERALIDADES:

Los  $\Delta^1$ -esteroides necesarios para los estudios estructurales y de actividad glucocorticoide debieron ser sintetizados, salvo en el caso de  $\Delta^1$ -cortisol (16), producto comercial conocido como prednisolona (ver estructuras correspondientes en la figura 1, pág. 4).

La principal fuente de  $\Delta^1$ -esteroides presente en literatura es la preparación de los mismos por deshidrogenación mediante el uso de microorganismos (por ejemplo Gliecladium roseum, Helminthosporium turcicum, Ophiobolus hethrostropus <sup>38</sup>), en forma específica y sin necesidad de proteger otros grupos funcionales. Sin embargo dada la infraestructura y práctica requerida para emplear esta técnica y dado que se disponía de 2,3-diciano-5,6-dicloro-benzo quinona (DDQ) <sup>39</sup>, un reactivo de deshidrogenación 1,2 de muy buena selectividad, se decidió preparar los  $\Delta^1$ -esteroides por métodos químicos.

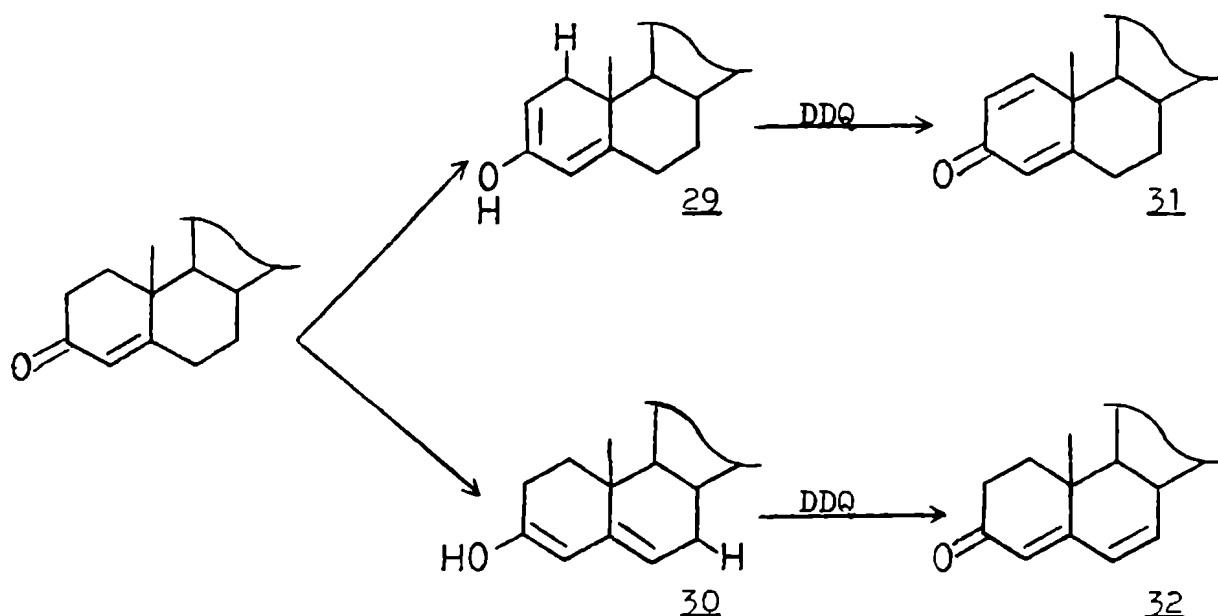
Para la síntesis de pregna-1,4-dien-3,20-dionas con y sin hidroxilos en posiciones 11 $\beta$ , 17 $\alpha$  y 21 se siguió como estrategia básica la siguiente secuencia esquemática:



La introducción de un doble enlace por sustracción de un hidruro y eliminación de un protón constituye la reacción más importante de la DDQ, principalmente la deshidrogenación de cetonas esteroideas dada la interesante modificación de la actividad biológica debido a esa funcionalización <sup>22</sup> y a la utilidad sintética de los deshidrocompuestos formados.

En el caso de  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides la versatilidad del reactivo permite la deshidrogenación en el anillo A (dando el  $\Delta^1$ -derivado) ó anillo B ( $\Delta^6$ -análogo) dependiendo de las condiciones empleadas <sup>39</sup>. La reacción procedería a través de un enol al cual se le sustraería un hidrógeno alílico, concluyendo con el reordenamiento y desprotonación para dar la cetona diinsaturada.

En el caso de los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides los enoles posibles son dos:  $\Delta^{2,4}$ -3-hidroxi (29) y  $\Delta^{3,5}$ -3-hidroxiesteroides (30) (figura 5), siendo el 2,4-dienol el formado por control cinético en ausencia de catalizadores, mientras que el 3,5-dienol es el termodinámicamente más estable, formándose rápidamente en presencia de catalizadores (por ejemplo ácidos fuertes). En ausencia de catalizadores la velocidad de enolización es menor que la de sustracción del hidruro y por lo tanto el enol es captado inmediatamente sin posibilidad de equilibración hacia el compuesto termodinámicamente más estable, dando el  $\Delta^1$ -derivado (31). En presencia de ácido la estabilización se hace mucho más rápida y por lo tanto la sustracción del hidruro se produce predominantemente sobre el enol termodinámicamente más estable, obteniéndose el  $\Delta^6$ -derivado (32).



**Figura 5:** Esquema de la reacción general entre DDQ y  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides.

Dado que se deseaba sintetizar  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto esteroides se realizaron las reacciones en ausencia de catalizadores de enolización. Se utilizó como solvente el benceno, trabajándose en condiciones anhidras, ya que el agua favorece la enolización y reduce la especificidad. El benceno tiene como ventaja adicional sobre el dioxano (ampliamente utilizado) su menor punto de ebullición, aumentando la especificidad de la reacción.

La necesidad de utilizar protectores, presentada en la secuencia esquemática de síntesis, depende de la existencia en la molécula de grupos funcionales sensibles a la DDQ en las condiciones de trabajo.

En las condiciones suaves de reacción con DDQ solo sufren

reacciones de oxidación aquellos hidroxilos que se encuentran en posiciones alílicas <sup>40</sup> ó  $\alpha$ -cetónicas. Por esta razón, un hidroxilo en posición  $11\beta$  no se afectaría por la DDQ en las condiciones de trabajo. Tampoco se afectaría un hidroxilo en posición  $17\alpha$ , a pesar de encontrarse en posición  $\alpha$  a una cetona, dado que su oxidación requeriría la ruptura de la cadena lateral <sup>40,41</sup>. En cambio un hidroxilo en posición 21 presenta todas las características estructurales indicativas de su reactividad frente a la DDQ (en posición  $\alpha$ -cetónica y susceptible de ser transformado fácilmente en un grupo aldehído) por lo cual sería aconsejable su protección.

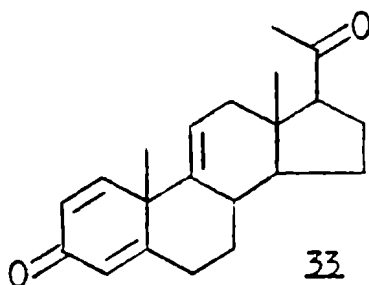
Por lo tanto los esteroides sintetizados pueden dividirse en dos grupos:

- Aquellos que no requerirían la protección de grupos funcionales y que por lo tanto podrían ser sintetizados por oxidación directa con DDQ del 1,2-dihidroesteroide correspondiente. En este grupo se ubican todos los 21-desoxiesteroides.
- Aquellos que, previo a la oxidación con DDQ debería procederse a la protección del grupo sensible (hidroxilo-21), completándose la secuencia de síntesis con la eliminación del grupo protector.
- 21-desoxiesteroides: Corresponden a este grupo pregna-1,4-dien-3,20-diona (9) y sus derivados  $11\beta$  y  $17\alpha$  hidroxilados 10, 11 y 15 (ver estructuras correspondientes en figura 1, pág. 4).

La síntesis de (9) a partir de progesterona (1) con DDQ

en benceno anhidro ya había sido descripta <sup>42</sup>. También se realizó la oxidación en presencia de p-nitrofenol como catalizador ácido débil <sup>42</sup>. En estas últimas condiciones se sintetizó también el 17-hidroxiderivado (11) <sup>43</sup>. Existe también como antecedente en literatura la preparación del 17 $\alpha$ -hidroxiesteroide a partir de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) utilizando dioxano como solvente <sup>44</sup>. En este caso los autores indicaron que el espectro de UV presentaba un  $\lambda_{\text{máx.}}$  244 m $\mu$  con un hombro a 295 m $\mu$  debido posiblemente a la presencia del  $\Delta^{1,6}$ -derivado.

En el caso de 11 $\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10) la única síntesis química descripta (existen varias síntesis utilizando microorganismos <sup>45</sup>), utilizó como esteroide de partida pregna-1,4,9(11)-trien-3,20-diona (33) introduciendo el hidroxilo-11 $\beta$  junto con un átomo de bromo en posición 9 $\alpha$  por una reacción de formación de bromohidrinas, seguida de la eliminación del halógeno con acetato de cromo (II) <sup>46</sup>. El único inconveniente de esta síntesis es la dificultad de obtener el esteroide de partida a no ser por deshidratación de un 11-hidroxiesteroide.

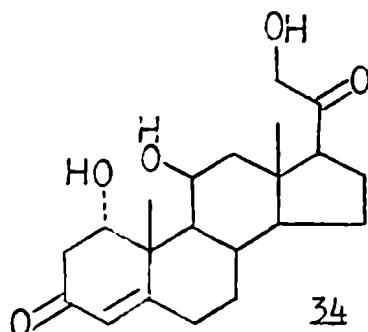




La única síntesis química de  $11\beta,17\alpha$ -dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (13) a partir del 1,2-dihidroanálogo 5 descripta utilizó  $\text{SeO}_2$  como oxidante en t-butanol <sup>47</sup>.

- 21-hidroxiesteroides: Corresponden a este grupo 21-hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (12) y sus  $11\beta$  y  $17\alpha$ -hidroxiderivados 14, 15 y 16 (las estructuras correspondientes se resumen en la figura 1, pág. 4).

Se encuentra descripta en literatura la oxidación con DDQ de 21-acetoxi-pregn - 4 - en-3,20-diona (25) <sup>42</sup>, donde no se menciona la hidrólisis del producto formado. También se informó la oxidación en presencia de p-nitrofenol <sup>43</sup>, o con  $\text{SeO}_2$  en t-butanol/ácido acético <sup>48</sup>. Por último 25 también fue preparado a partir de preña-1,4-dien-3,20-diona (9) por reacción con tetraacetato de plomo (acetoxilación) <sup>49</sup>. En cambio no se encuentra descripta ninguna síntesis química del  $11\beta,21$  -dihidroxi-esteroide 14 que emplee algún tipo de deshidrogenación. La síntesis más simple descripta en este caso es la que obtuvo el  $\Delta^1$ -esteroide por deshidratación de  $1\alpha,11\beta,21$ -trihidroxiprogesterona (34) aislada de pescados cartilaginosos <sup>50</sup>.



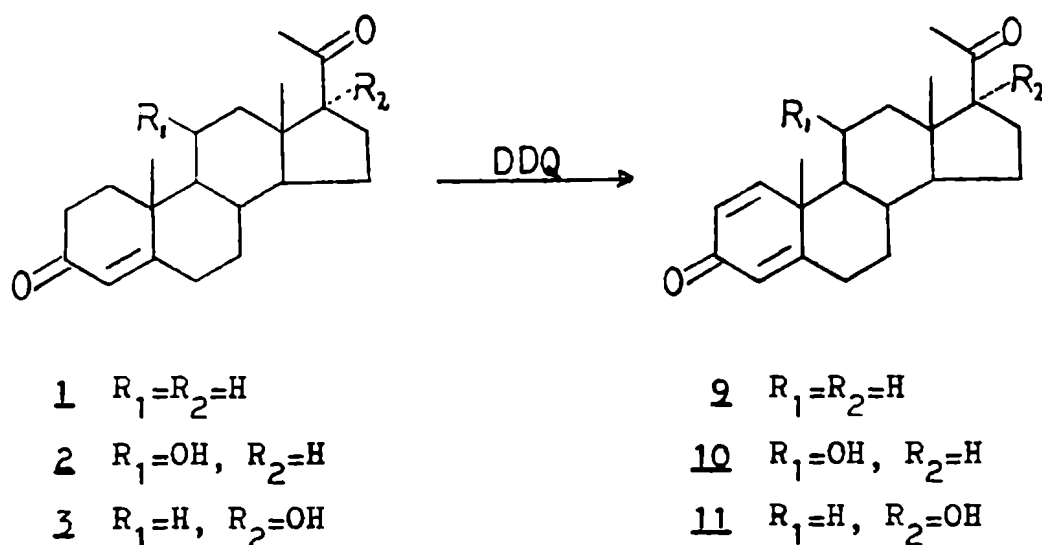
Existen varias publicaciones sobre la preparación de  $\Delta^1$ -cortexolona (15) a partir del 1,2-dihidroesteroide correspondiente (2) utilizando  $\text{SeO}_2$  <sup>51</sup> y otros derivados del mismo <sup>52</sup> como reactivo oxidante, así como técnicas de bromación en C2 y posterior deshidrobromación <sup>53</sup>. También se encuentra descrita la preparación a partir del 21-desoxiesteroide correspondiente 11 mediante la reacción de Stork, discutida anteriormente (pág. 21) <sup>33</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION:

### II.2.1. Síntesis de 21-desoxi-pregna-1,4-dien-3,20-dionas:

$\Delta^1$ -progesterona (9),  $\Delta^1$ -11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (10) y  $\Delta^1$ -17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (11) fueron sintetizados fácilmente a partir de los correspondientes 1,2-dihidroesteroides (1, 2 y 3 respectivamente) por oxidación directa con DDQ en benceno anhidro. Los productos obtenidos luego de ser pasados por una columna de a lúmina neutra para eliminar el exceso de reactivo y su producto secundario, la hidroquinona correspondiente, resultaron estar muy poco impurificados, siendo necesario simplemente recrystalizarlos para obtenerlos puros (figura 6). Los resultados se resumen en la tabla II-2.

Las impurezas observadas fueron una pequeña proporción del esteroide de partida en el caso de 11 y los  $\Delta^6$  (35) y  $\Delta^{1,6}$  (36) derivados de 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (2) en el caso de 10, identificados por resonancia magnética nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H)



**Figura 6:** Síntesis de  $\Delta^1$ -progesterona (**9**),  $\Delta^1$ -11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (**10**) y  $\Delta^1$ -17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (**11**) por oxidación con DDQ.

**Tabla II-2:** Oxidación directa con DDQ de 21-desoxiesteroides.

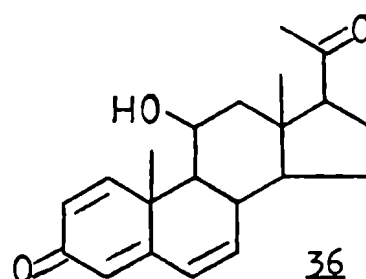
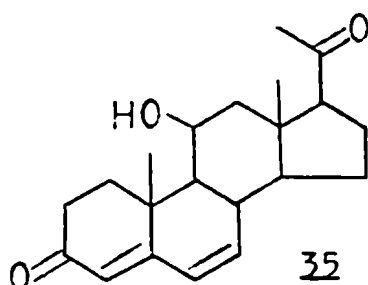
Mat. prima	Producto	rend. % <sup>(a)</sup>	$\Delta^{1,4}/\Delta^4$
<b>1</b>	<b>9</b>	75 %	(b)
<b>2</b>	<b>10</b>	80 %	(b,c)
<b>3</b>	<b>11</b>	86 %	95/5
<b>5</b>	<b>13</b>	16 %	20/80

(a)  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroide aislado.

(b) No se observaron restos del material de partida

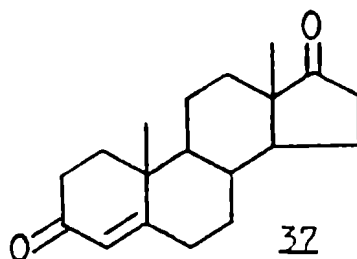
(c) Trazas de  $\Delta^6$  y  $\Delta^{1,6}$ -derivados.

y de  $^{13}\text{C}$  (RMN- $^{13}\text{C}$ ) de la mezcla de reacción. Dado que no se observó la formación del  $\Delta^{1,6}$ -derivado en el caso de la oxidación de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) queda demostrada la mejor selectividad de la reacción cuando se trabajó en condiciones más controladas (benceno a reflujo en lugar de dioxano, de mayor temperatura de ebullición).



La formación de  $\Delta^6$  y  $\Delta^{1,6}$ -derivados era factible dado que el control cinético de la reacción lleva a la formación del  $\Delta^1$ -esteroide, lo cual no implica que no se forme una pequeña proporción del  $\Delta^6$ -derivado el cual sufriría un nuevo ataque por la DDQ con la consiguiente formación del  $\Delta^{1,6}$ -esteroide (único origen de este esteroide ya que el  $\Delta^1$ -derivado no se reoxida).

Ringold y Turner <sup>54</sup> encontraron una relación  $\Delta^1$ :  $\Delta^6$ :  $\Delta^{1,6}$  igual a 10:1:1 en la oxidación de androsta-4-en-3,17-diona (37), de lo cual se desprende una relación en la sustracción de hidruros de C1 y C7 de 5:1. Esta relación depende de factores cinéticos, principalmente las distintas velocidades de enolización hacia uno u otro lado y la velocidad de reacción de estos con la DDQ.



En base a los buenos resultados obtenidos en la oxidación de los  $11\beta$  y  $17\alpha$ -hidroxiesteroides 2 y 3 se intentó la deshidrogenación directa de 21-desoxicortisol (5) con DDQ. Sorprendentemente la oxidación en las condiciones empleadas anteriormente (1,3 equivalentes de DDQ), fue prácticamente nula, recuperándose el esteroide de partida. Para verificar si esto se debía a una captación de la DDQ por el sistema  $11\beta, 17\alpha$ -dihidroxi del tipo propuesto en la figura 7,

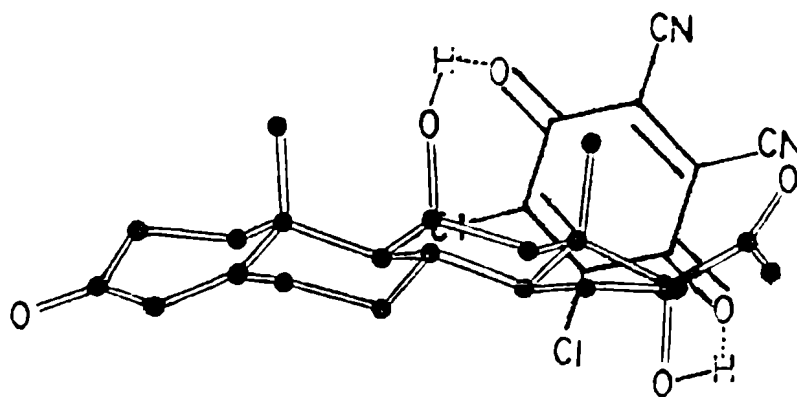


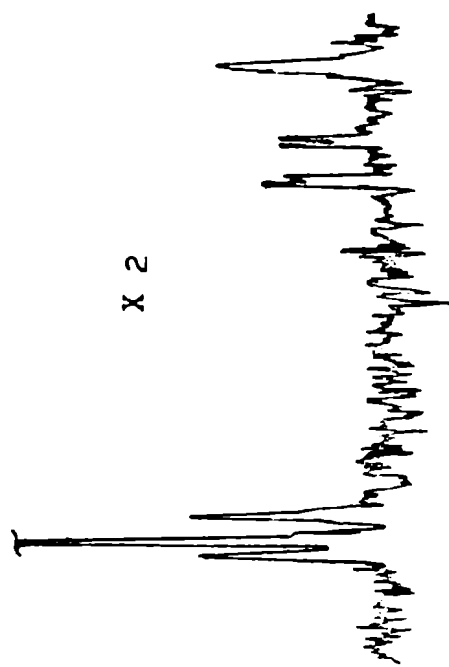
Figura 7: Hipotética captación de DDQ por el sistema  $11\beta, 17\alpha$ -dihidroxi en 21-desoxicortisol (5).

disminuyendo la cantidad de quinona en solución, se intentó realizar la reacción con un gran exceso de DDQ (5,4 equivalentes). El resultado tampoco fue satisfactorio ya que sólo se logró un 20 % de conversión en el  $\Delta^1$ -derivado aún después de 48 horas de reacción. (tabla II-2, pág. 35).

Se desconoce la razón por la cual el dihidroxiesteroide 5 no reaccionó con la DDQ en las condiciones que sí lo hicieron y con buen rendimiento tanto el  $11\beta$ -hidroxiderivado 2 como el  $17\alpha$ -hidroxianálogo 3 (aunque en este último caso quedó una pequeña porción de material sin reaccionar).

Para la determinación del grado de conversión logrado durante la oxidación con DDQ de distintos esteroides resultó de suma utilidad la resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN- $^1\text{H}$ ). Este método fue muy adecuado ya que los esteroides de partida ( $\Delta^4$ -3-cetoderivados) presentan una señal a  $\delta$  5,69-5,76 ppm (banda ancha) correspondiente al H<sub>4</sub> olefínico (tabla III-9, pág. 181), mientras que los productos deshidrogenados ( $\Delta^{1,4}$ -3-cetoanálogos) presentan tres señales en la región olefínica:  $\delta$  7,04-7,26 ppm (doblete, J= 10 Hz) correspondiente a H<sub>1</sub>, 6,23-6,27 ppm (doble doblete, J= 10 y 2 Hz) correspondiente a H<sub>2</sub> y 6,01-6,08 ppm (banda ancha) debido al H<sub>4</sub>. Como puede apreciarse, estas últimas señales aparecen desplazadas respecto de las correspondientes a los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides, permitiendo la observación y cuantificación de restos de los mismos.

La figura 8 muestra, como ejemplo, la región olefínica del espectro de RMN- $^1\text{H}$  de la mezcla de oxidación directa de 21-deoxicortisol (5) con DDQ.



5 21-desoxycortisol.  
 13  $\Delta^1$ -21-desoxycortisol.

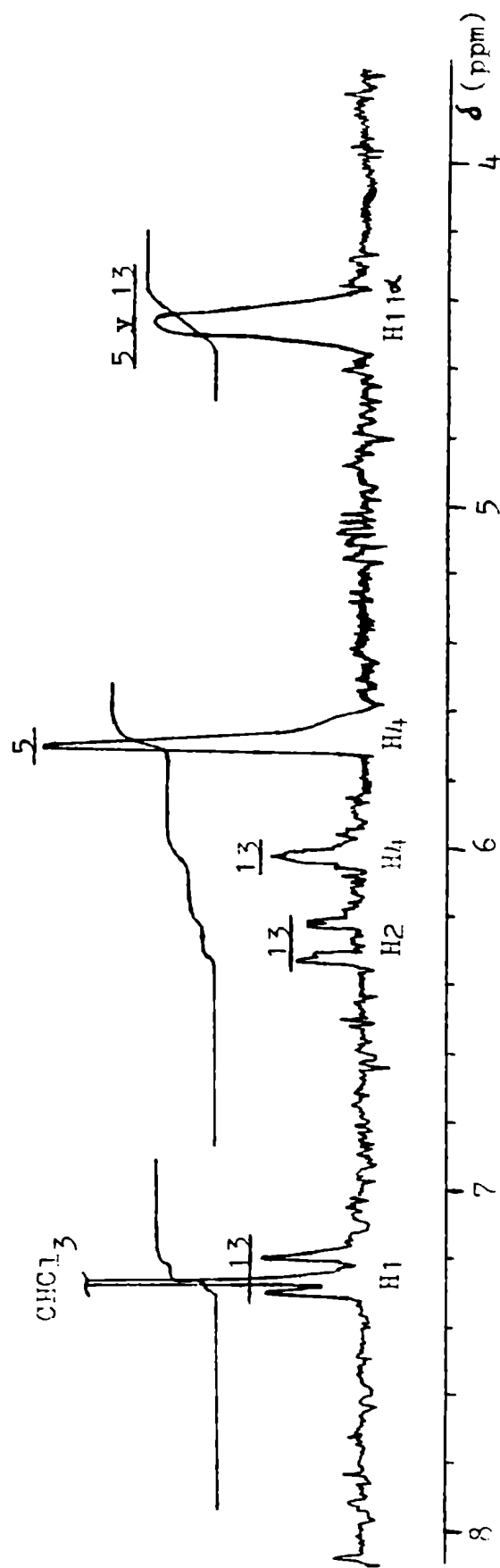


Figura 8: Región olefínica e  $H_{11\alpha}$  del espectro RMN- $^1H$  del producto de reacción entre 21-desoxycortisol (5) y DDQ (5,4 eq., 48 hs a temperatura de reflujo).

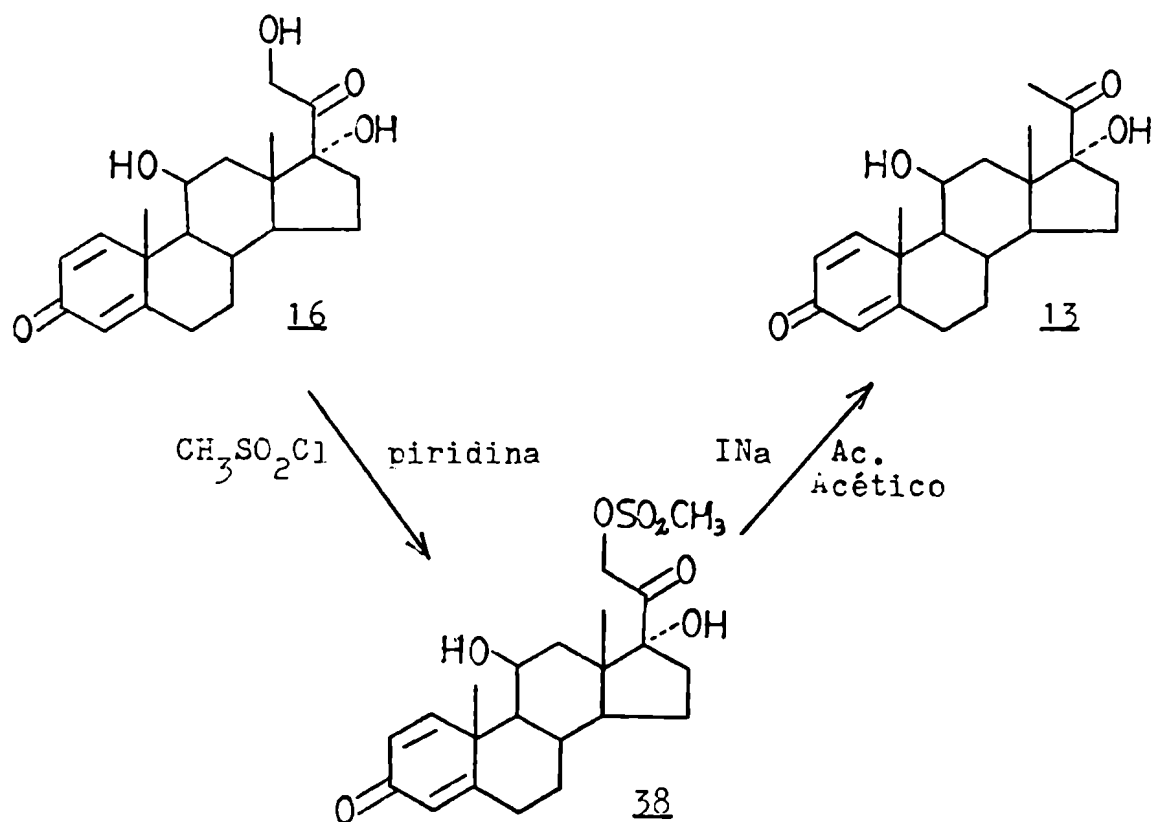
No habiendo obtenido resultados satisfactorios en la síntesis de  $11\beta,17\alpha$ -dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (13) por oxidación directa con DDQ, se debió ensayar otro camino. Dado que se disponía de  $11\beta,17\alpha,21$ -trihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (16), se decidió ensayar sobre este esteroide la secuencia de síntesis realizada con cortisol (8)(pág. 26) para la obtención de 21-desoxicortisol (5) <sup>34</sup>. La secuencia de reacción empleada presenta la ventaja de partir del  $\Delta^1$ -derivado puro, libre del  $\Delta^4$ -3-cetoesteroide correspondiente, cuya separación en los casos anteriores donde no se produjo conversión total fue bastante engorrosa.

La mesitilación de 16 dio el 21-mesitilderivado 38 con buen rendimiento (88 %). Cuando se intentó la eliminación en las condiciones descriptas (1 hora a temperatura ambiente) <sup>35</sup> se logró solo una remoción parcial del protector (analizado por RMN-<sup>1</sup>H). La eliminación total del mesitilo se logró simplemente prolongando el tiempo de reacción (20 hs) obteniéndose 13 en forma pura, el cual solo requirió ser recrystalizado para su utilización en ensayos biológicos (rendimiento global: 65 %)(figura 9).

Por otra parte se decidió estudiar en mayor detalle el particular comportamiento de 21-desoxicortisol (5) frente a la DDQ realizando la oxidación del esteroide derivatizado con distintos grupos protectores, seguida de la eliminación de los mismos.

La esterificación de los hidroxilos en posiciones  $17\alpha$  (terciario) y  $11\beta$  (fuertemente impedido estericamente) no se produce en las condiciones básicas habituales de acetilación (anhídrido acético/piridina a temperatura ambiente). En cambio en condicio





**Figura 9:** Síntesis de  $\Delta^1$ -21-desoxicortisol (**13**) a partir de  $\Delta^1$ -cortisol (**16**).

nes ácidas (anhídrido acético/ácido acético en presencia de ácido p-toluensulfónico ó ácido perclórico) se logra la acetilación de ambos <sup>55</sup>.

Esta secuencia de reacciones fue ensayada también con 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (**3**); la esterificación de este esteroide al compuesto **39** se logró con muy buen rendimiento (97 %), producto que fue oxidado con DDQ en las condiciones normales de reacción. Cabe destacar que en este caso la conversión del  $\Delta^4$ -3-cetoesteroi

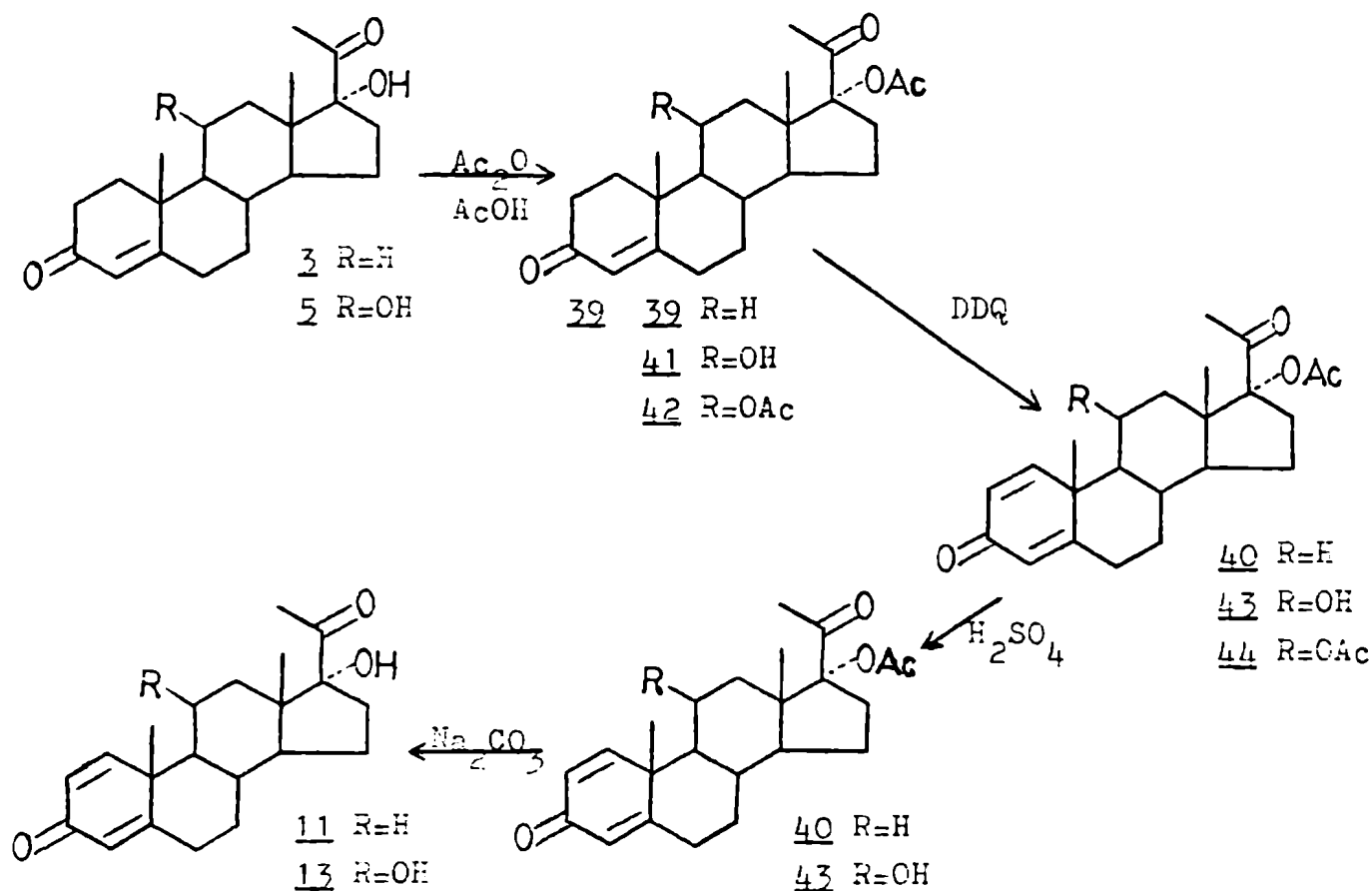
de a 40 fue total, no observándose restos del compuesto de partida, a diferencia de la oxidación directa donde se recuperó una pequeña cantidad de dicho compuesto (figura 10).

La acetilación ácida del 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxiesteroide 5 produjo dos compuestos, analizados por cromatografía en capa delgada, de mayor  $R_f$  que el esteroide de partida, siendo probablemente un mono y el diacetato correspondientes (41 y 42). La oxidación con DDQ resultó ser nuevamente parcial, ya que el análisis cromatográfico del producto indicó la aparición de dos nuevos compuestos de  $R_f$  levemente menor que el de los esteroides de partida, pero también indicó que estos no habían desaparecido totalmente.

Sobre 17 $\alpha$ -acetoxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (40) se ensayaron tanto las condiciones ácidas de hidrólisis (transesterificación) como las básicas. Los resultados fueron los esperados (el esteroide no se afectó por la hidrólisis ácida y se desacetiló en medio básico) obteniéndose el 17 $\alpha$ -hidroxiesteroide (11) prácticamente puro con un rendimiento global del 80 %.

La hidrólisis ácida de la mezcla de oxidación con DDQ de 41 y 42 provocó la desaparición total del par de productos de mayor  $R_f$ , quedando solamente el par de menor  $R_f$ . No aparecieron nuevos compuestos de  $R_f$  similar al del 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxiesteroide de partida (5). Teniendo en cuenta que en medio ácido solo se hidroliza el acetato de posición 11 $\beta$  y que no se formó ningún producto totalmente desacetilado, la mezcla resultante de la hidrólisis estaría formada por 17 $\alpha$ -acetoxi-11 $\beta$ -hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona (41) y su  $\Delta^1$ -derivado (43).

En base a eso es posible deducir que la mezcla original



**Figura 10:** Síntesis de  $17\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (**11**) y su  $11\beta$ -hidroxiderivado (**13**) por oxidación con  $DDQ$  de los acetatos correspondientes.

estaba formada por  $11\beta, 17\alpha$ -diacetoxi-pregn-4-en-3,20-diona (**42**) y  $17\alpha$ -acetoxi- $11\beta$ -hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona (**41**), es decir que la acetilación en posición  $17\alpha$  fue total mientras que en posición  $11\beta$  solo fue parcial.

La mezcla resultante de la hidrólisis ácida no se analizó por métodos espectroscópicos ya que se realizó directamente la hidrólisis básica sin aislar el producto de reacción. Esta última

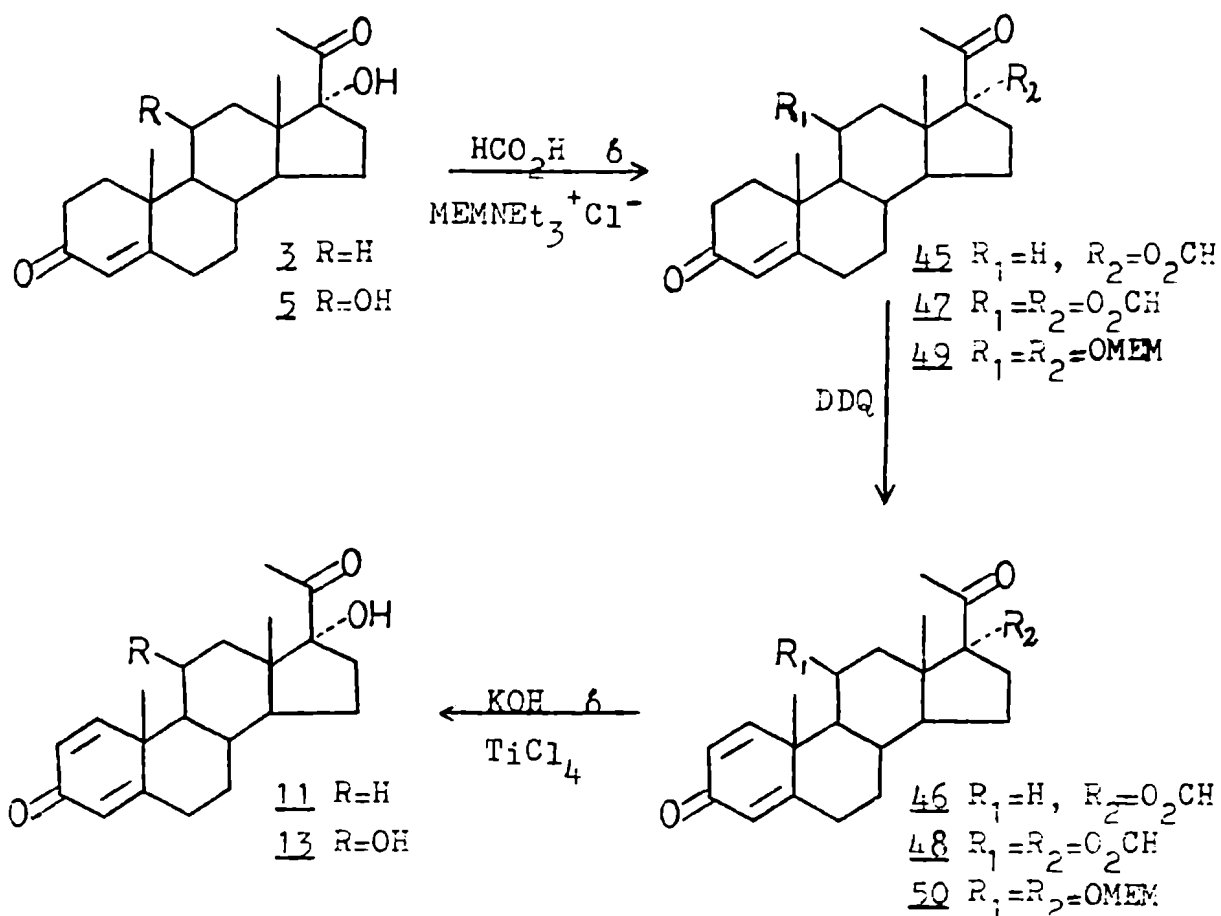
produjo una mezcla de esteroides totalmente desacetilados. El análisis espectroscópico (RMN- $^1\text{H}$ ) de la mezcla obtenida con buen rendimiento crudo (80 %) indicó una mejor conversión en el  $\Delta^1$ -derivado (75 %) que en la oxidación directa del esteroide (20 %).

También se ensayó la formilación como método de protección. Este método presenta la ventaja que la hidrólisis básica elimina tanto el formilo de posición  $17\alpha$  (al igual que en los acetatos) como el de posición  $11\beta$  (estable en el caso de los acetatos) y por lo tanto se simplificaría un paso en la síntesis <sup>56</sup>.

Nuevamente se probó también la secuencia con  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (3). La formilación de este con ácido fórmico/ácido p-toluensulfónico se logró con muy buen rendimiento (98 %)(compuesto 45, figura 11), seguida de la oxidación del esteroide protegido, produciéndose la transformación total del compuesto en su  $\Delta^1$ -derivado 46. Finalmente, la hidrólisis básica resultó en la producción de  $\Delta^1$ - $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (11) con un rendimiento del 50 %, menor al obtenido por oxidación directa pero libre del esteroide de partida (confirmando en este sentido los resultados obtenidos con el derivado acetilado)(figura 11).

La formilación del  $11\beta,17\alpha$ -dihidroxiesteroide 5 fue total (producto homogéneo en cromatografía en capa delgada y una señal para el  $\text{H}_{11\alpha}$  en RMN- $^1\text{H}$ ) lográndose con buen rendimiento (85 %)(compuesto 47)(figura 11).

La oxidación con DDQ produjo el  $\Delta^1$ -derivado (48) impurificado con una pequeña cantidad del producto sin reaccionar (20 %) con lo cual no se mejoró mayormente la conversión respecto del acetilderivado (25 % sin reaccionar).



**Figura 11:** Síntesis de 17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (11) y su 11 $\beta$ -hidroxiderivado (13) por oxidación con DDQ de los formiatos y metoxietoximetil derivados correspondientes (MEM= metoxietoximetilo).

La hidrólisis final produjo un rendimiento crudo de solo el 44 % a pesar de requerirse solo un paso para eliminar los formiatos en lugar de la secuencia ácida/básica del caso de los acetatos.

Finalmente, otro protector ensayado fue el metoxietoximetilo<sup>57</sup> que diera buenos resultados en los casos de cortexolona (2)

y cortisol (8) como se discutirá más adelante (pag. 59).

Se ensayó esta secuencia de síntesis (figura 11), lográndose resultados variables de rendimiento (15-70 %) desconociéndose las causas del mismo. Nuevamente en este caso la conversión en el  $\Delta^1$ -derivado no fue total (80 %) aunque notablemente mayor que en el caso de la oxidación directa.

Los resultados obtenidos utilizando distintos grupos protectores se resumen en la tabla II-3 (en la misma se incluye la oxidación directa con fines comparativos).

Tabla II-3: Síntesis de  $17\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (11) y su  $11\beta$ -hidroxiderivado (13) por oxidación con DDQ de distintos derivados de los mismos.

Mat. prima	Protector	Producto	rend. % <sup>(a)</sup>	$\Delta^{1,4}/\Delta^4$
<u>3</u>	--	<u>11</u>	86 %	95/5
<u>5</u>	--	<u>13</u>	16 %	20/80
<u>3</u>	Acetato	<u>11</u>	80 %	(b)
<u>5</u>	Acetato	<u>13</u>	60 %	75/25
<u>3</u>	Formiato	<u>11</u>	50 %	(b)
<u>5</u>	Formiato	<u>13</u>	35 %	80/20
<u>5</u>	MEM (c)	<u>13</u>	10-60 %	85/15

(a)  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroide aislado.

(b) No se observaron restos del material de partida.

(c) Metoxietoximetil derivado.

## II.2.2. Síntesis de 21-hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-dionas:

Para obtener  $\Delta^1$ -11-desoxicorticosterona (12) y  $\Delta^1$ -corticosterona (14) se utilizó como protector el acetato. La acetilación del hidroxilo 21 se produjo en las condiciones normales de acetilación (anhidrido acético/piridina).

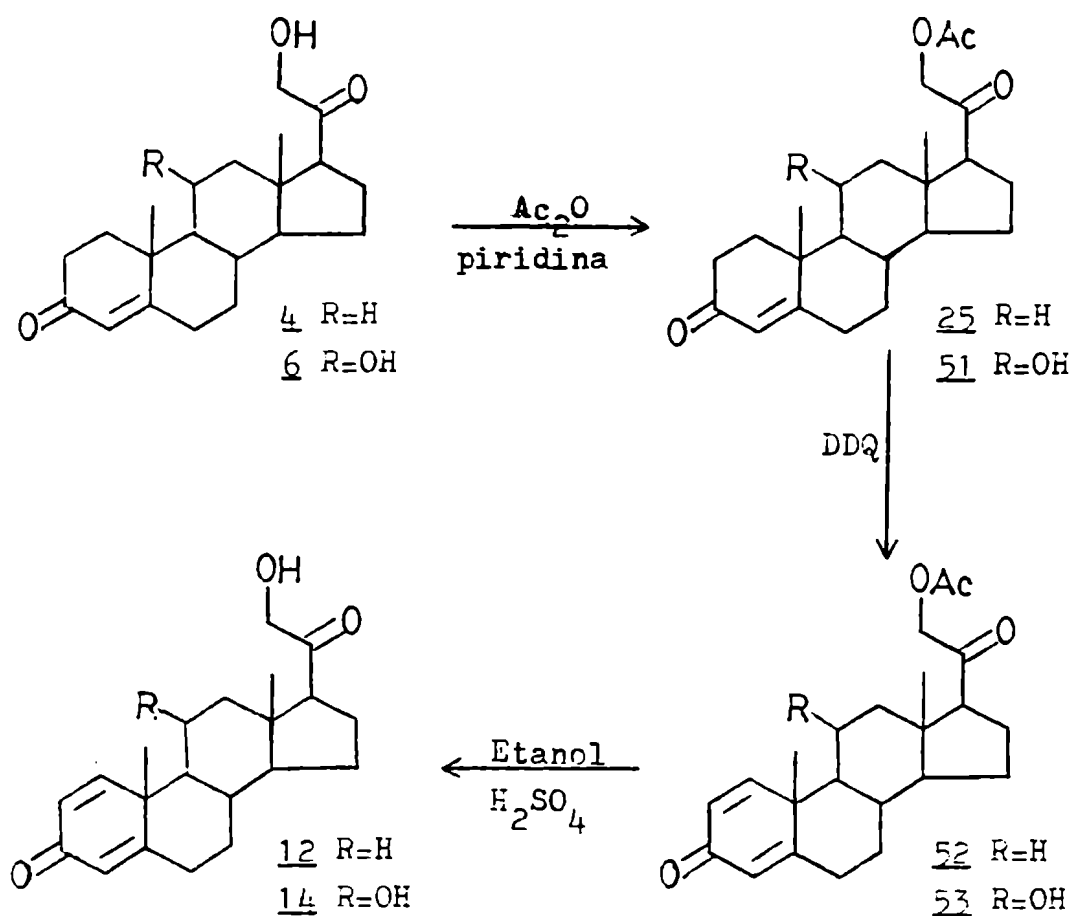
La oxidación con DDQ de los acetatos 25 y 51 produjo los  $\Delta^1$ -derivados correspondientes 52 y 53 prácticamente puros. No se observaron rastros de los  $\Delta^6$  y  $\Delta^{1,6}$ -derivados, pero sí de un pequeño resto de los esteroides de partida.

Finalmente la eliminación del protector se logró por transesterificación ácida con etanol/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  <sup>58</sup> con rendimientos globales (luego de la purificación por cromatografía en columna) de 56 y 80 % para 12 y 14 respectivamente (figura 12).

En el caso de 21-acetoxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (52) se ensayó también la hidrólisis básica del protector (NaOH/metanol). Esta reacción presenta la ventaja de su rapidez (10') <sup>33</sup> frente a la transesterificación (9 hs a reflujo) siendo el rendimiento de las mismas similar (90 %).

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla II-4.

Dado los buenos resultados observados para la síntesis de cortexolona (7) a partir de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) (pág. 23) y teniendo en cuenta la facilidad con que se puede obtener  $\Delta^1$ - $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (11) a partir del esteroide anterior por oxidación directa con DDQ, se decidió preparar  $\Delta^1$ -cortexolona (15) por el método de Stork. Es así que 11 fue iodado en posición 21 (compuesto 54, figura 13) y transformado inmediatamente en el 21-aceta



**Figura 12:** Síntesis de 21-hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (12) y su  $11\beta$ -hidroxiderivado (14).

to correspondiente (55), concluyendo la reacción con la hidrólisis en condiciones controladas del acetato <sup>33</sup> para obtener el esteroide deseado (figura 13).

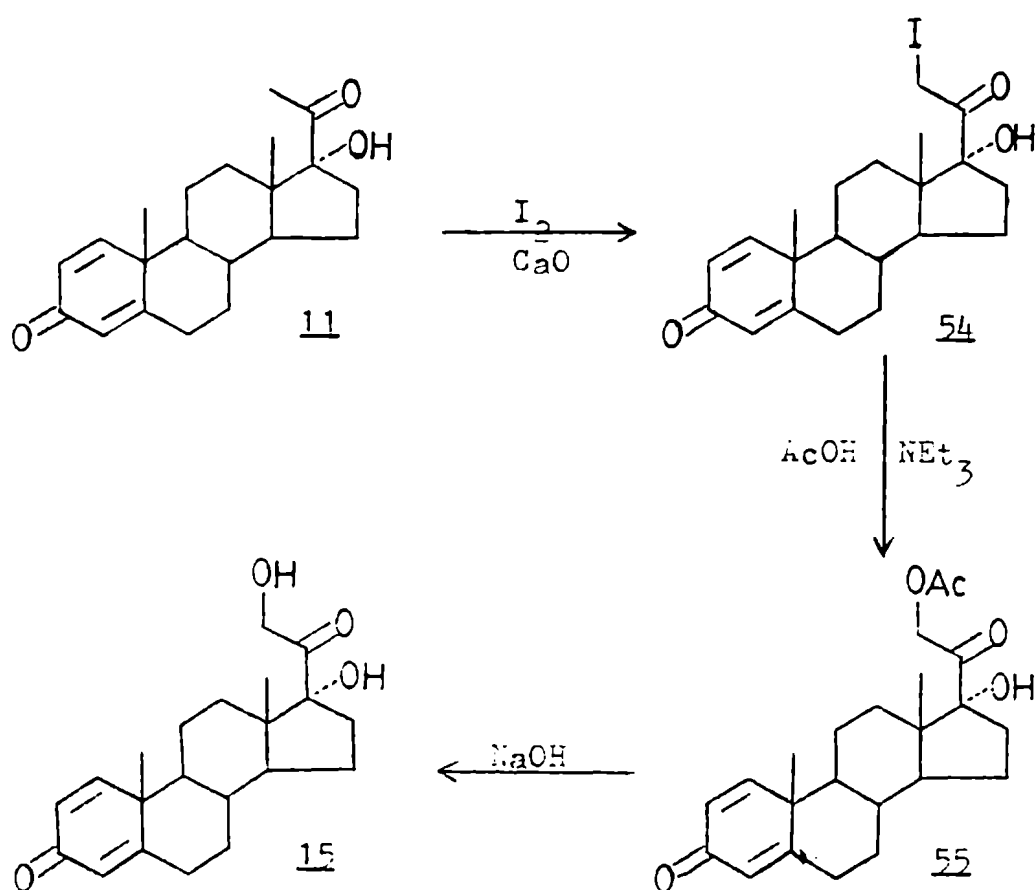
De este modo, realizando antes la oxidación con DDQ, se evitan los pasos de protección y desprotección requeridos cuando se encuentra presente un hidroxilo en posición 21.

La transformación del 21-iododerivado (54) en el acetato correspondiente (55) se llevó a cabo en idénticas condiciones al



caso de la síntesis de cortexolona (7), sin requerirse la reacción con  $\text{NaHSO}_3$  en metanol a reflujo, imprescindible en la síntesis de 11-desoxicorticosterona (4) (ver discusión al respecto en pág. 24).

De este modo se completó la síntesis de las pregna-1,4-dien-3,20-dionas requeridas para los estudios biológico-estructurales encarados.



**Figura 13:** Síntesis de 17α,21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (15) a partir de 17α-hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (11).

Independientemente de estos resultados fue interesante estudiar la factibilidad de una síntesis de  $\Delta^1$ -cortexolona (15) a partir de cortexolona (2) por oxidación con DDQ mediante la elección de un protector adecuado (tabla II-4).

Tabla II-4: Síntesis de  $\Delta^1$ -11-desoxicorticosterona (12),  $\Delta^1$ -corticosterona (14),  $\Delta^1$ -cortexolona (15) y  $\Delta^1$ -cortisol (16) por oxidación con DDQ utilizando distintos protectores.

Mat. prima	Protector	Hidról.	Producto	rend. (a)	$\Delta^{1,4}/\Delta^4$ (b)
<u>4</u>	Acetato	H <sup>+</sup>	<u>12</u>	56 %	90/10
<u>4</u>	Acetato	OH <sup>-</sup>	<u>12</u>	55 %	90/10
<u>6</u>	Acetato	H <sup>+</sup>	<u>14</u>	80 %	90/10
<u>2</u>	BMD (c)	H <sup>+</sup>	(d)	--	90/10
<u>2</u>	EDQ (c)	H <sup>+</sup>	<u>15</u>	10 %	60/40
<u>2</u>	Acetato	H <sup>+</sup>	(e)	--	50/50
<u>2</u>	Acetato	OH <sup>-</sup>	(d)	--	50/50
<u>2</u>	MEM (c)	TiCl <sub>4</sub>	<u>15</u>	50 %	90/10
<u>2</u>	MEM (c)	TiCl <sub>4</sub>	<u>16</u>	28 %	75/25

(a)  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroide correspondiente, aislado.

(b) Cualquiera sea la cadena lateral resultante.

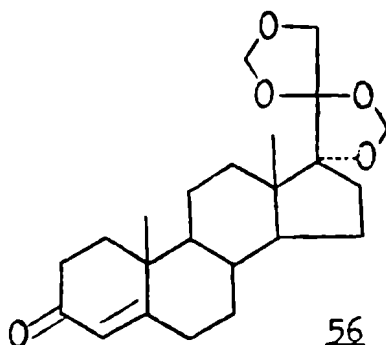
(c) BMD: Bismetilendioxi; EDO: Pencilidendioxi; MEM: Metoxietoximétilderivados.

(d) Producto desconocido, descomposición de la cadena lateral.

(e) 21,21-dietoxi-20-cetoesteroide (ver estructura correspondiente en figura 17, pág. 58 ).

El primer protector ensayado fue la formación del bismetilendioxidoderivado. Este es el protector típico del sistema  $17\alpha,21$ -dihidroxi-20-ceto <sup>59</sup>.

La reacción en fase heterogénea (cortexolona (2) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + Formalina +  $\text{HCl}_{(c)}$ ) produjo con buen rendimiento el esteroide esperado (compuesto 56). Otro tanto sucedió con la deshidrogenación del esteroide protegido. En cambio, cuando se ensayó la hidrólisis con ácido fórmico acuoso (15-35' a reflujo) <sup>60</sup> ó ácido acético (60' a reflujo) <sup>59</sup> según se indica en literatura, no se observó conversión en la dihidroxicetona deseada sino que se produjo la descomposición del esteroide (el producto fue analizado solo por cromatografía en placa).



El siguiente grupo protector ensayado fue el  $17\alpha,21$ -benzildendioxidoderivado. Para esto fue menester preparar previamente el dietilacetal del benzaldehído <sup>61</sup> por reacción de benzaldehído con etanol absoluto.

A partir del acetal formado se realizó la transferencia

del mismo a los hidroxilos  $17\alpha$  y 21 del esteroide, en condiciones de catálisis ácida (ácido p-toluensulfónico) en benceno anhidro <sup>62</sup>. La transferencia del acetal se ve favorecida por la formación de un compuesto cíclico de seis miembros (compuesto 52, figura 14).

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H del producto obtenido (figura 15) mostró la existencia de dos especies, en diferente proporción, correspondiente a los dos diasterómeros posibles 52-a y 52-b.

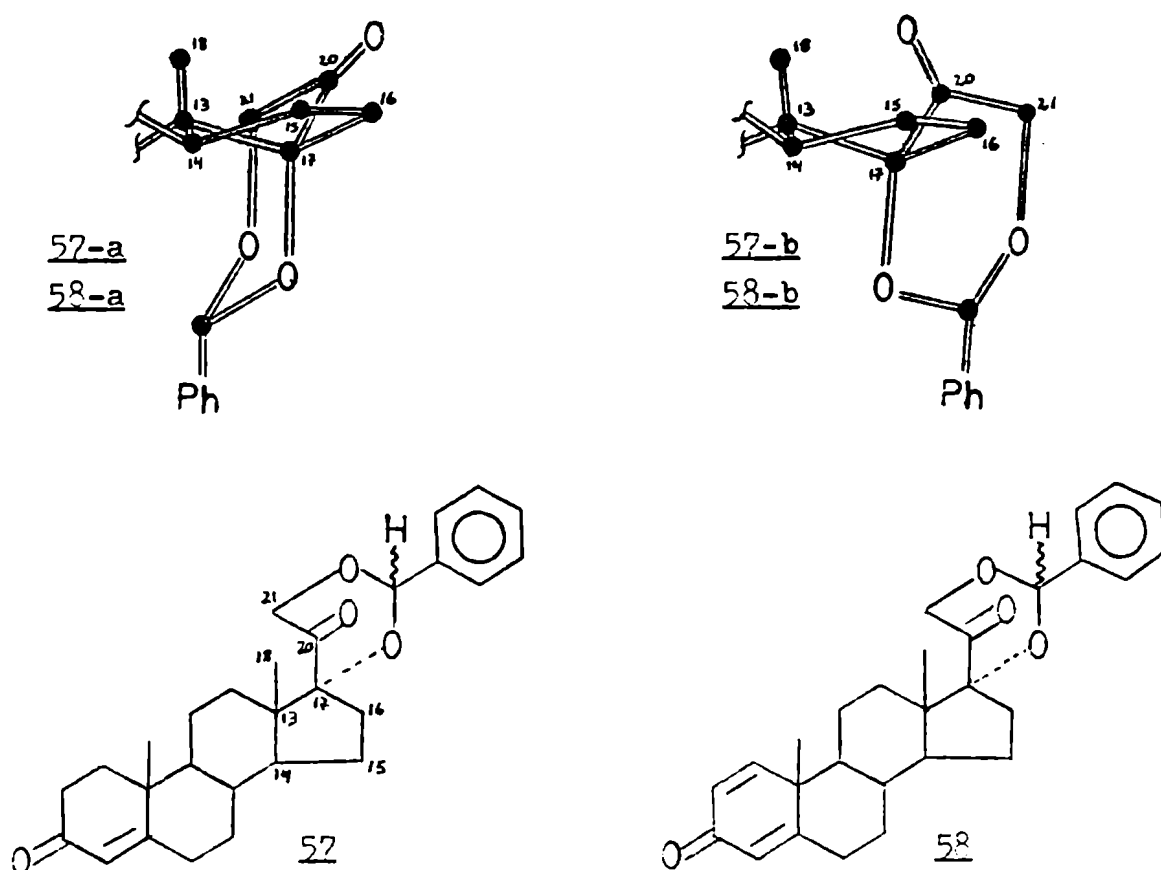


Figura 14: Formas diasterómeras del  $17\alpha$ ,21-bencilidendioxiderivado de cortexolona y  $\Delta^1$ -cortexolona en su conformación más estable.

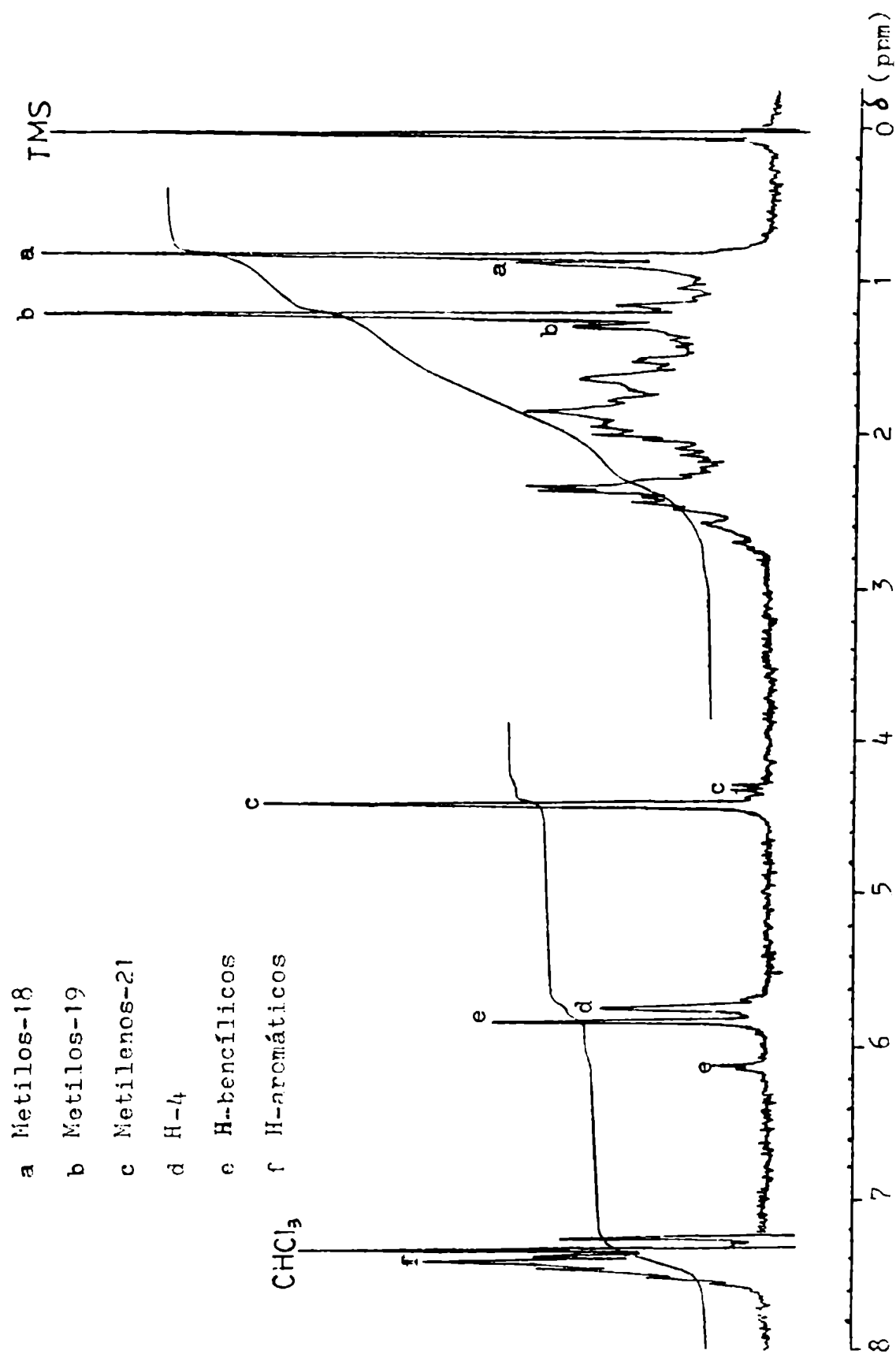


Figura 15: Espectro RMN-<sup>1</sup>H de 17 $\alpha$ ,21-bencilidendioxi-progesterona (52) (ver estructuras correspondientes en la figura 14).

El análisis de modelos moleculares de ambas formas indicó que en la forma 57-b el metilo 18 se encontraría en la región de desprotección del carbonilo 20; en cambio en 57-a el carbonilo se encontraría eclipsando aproximadamente la unión C16-C17, de forma tal que el cono de protección del mismo (por encima y por debajo del plano del carbonilo) abarcaría una región, dentro de la cual se encontraría el metilo 18, sufriendo este por lo tanto tal desprotección.

La señal del metilo 18 a  $\delta$  0,80 ppm correspondería entonces a 57-a mientras que la señal a  $\delta$  0,84 ppm sería la del metilo 18 en 57-b, siendo la primera de mayor importancia (relación 5:1). Este hecho confirma la asignación propuesta ya que era de esperarse que 57-a fuese más estable que 57-b. Esto se debe a la posible interacción estérica metilo-18/oxígeno-20 en 57-b mientras que en 57-a el carbonilo se encontraría en la conformación más favorable de la cadena lateral (el carbonilo 20 de progesterona (1), es decir, de una cadena abierta, adopta una conformación en la cual el carbonilo se encuentra eclipsando la unión C16-C17) <sup>63</sup>.

En el espectro del bencilidendioxiderivado de cortexolona (compuesto 52) se observó además el desdoblamiento de las señales de los hidrógenos de posición 21 y el hidrógeno bencílico, las cuales pudieron asignarse a 57-a y 57-b en base a su intensidad relativa.

Resulta interesante además que los hidrógenos del metileno-21 no se diferencian en 57-a (dando un singuleto a  $\delta$  4,36 ppm), mientras que producen dos señales en el caso de 57-b (cuarteto AB centrado en  $\delta$  4,25 ppm). También puede verse la notable dife-

rencia en el desplazamiento químico de las señales correspondientes al hidrógeno bencílico ( $\delta = 5,76$  y  $6,08$  ppm).

La oxidación con DDQ del producto protegido dio como resultado una mezcla del  $\Delta^1$ -derivado 58 (principal) y el esteroide sin reaccionar los cuales fueron separados por cromatografía en columna. La conversión fue de aproximadamente el 60 %. El esteroide sin reaccionar fue reoxidado.

Finalmente la hidrólisis del esteroide se produjo en condiciones ácidas suaves (ácido clorhídrico en metanol, 15' a temperatura de reflujo) obteniéndose el producto deseado junto con otro compuesto de  $R_f$  similar al bencilidendioxiderivado (analizado por cromatografía en capa delgada). El rendimiento de la secuencia de reacciones, sin considerar el reciclaje de intermediarios que no reaccionaron, fue de solo el 10 %.

También se ensayó la síntesis de  $\Delta^1$ -cortexolona (15) via acetilación de su 1,2-dihidroderivado 7, oxidación con DDQ e hidrólisis final, tanto en condiciones ácidas (etanol/ $H_2SO_4$ ) 58 como básicas ( $Na_2CO_3$  en metanol/agua). En ambos casos no se obtuvo el producto deseado.

El análisis por RMN- $^1H$  del producto de hidrólisis ácida indicó que estaba formado por una mezcla de  $\Delta^4$ -3-ceto y  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroides cuya cadena lateral sería el sistema 21,21-dietoxi-20-ceto (59) esquematizado en la figura 16. En la misma se presenta el espectro RMN- $^1H$  de la mezcla de hidrólisis ácida y, para su comparación el espectro correspondiente a cortexolona. En el primero se observa la desaparición de las señales del metileno-21, siendo estas reemplazadas por un doblete a  $\delta$  4,54 ppm ( $J=2Hz$ ) y un quinto

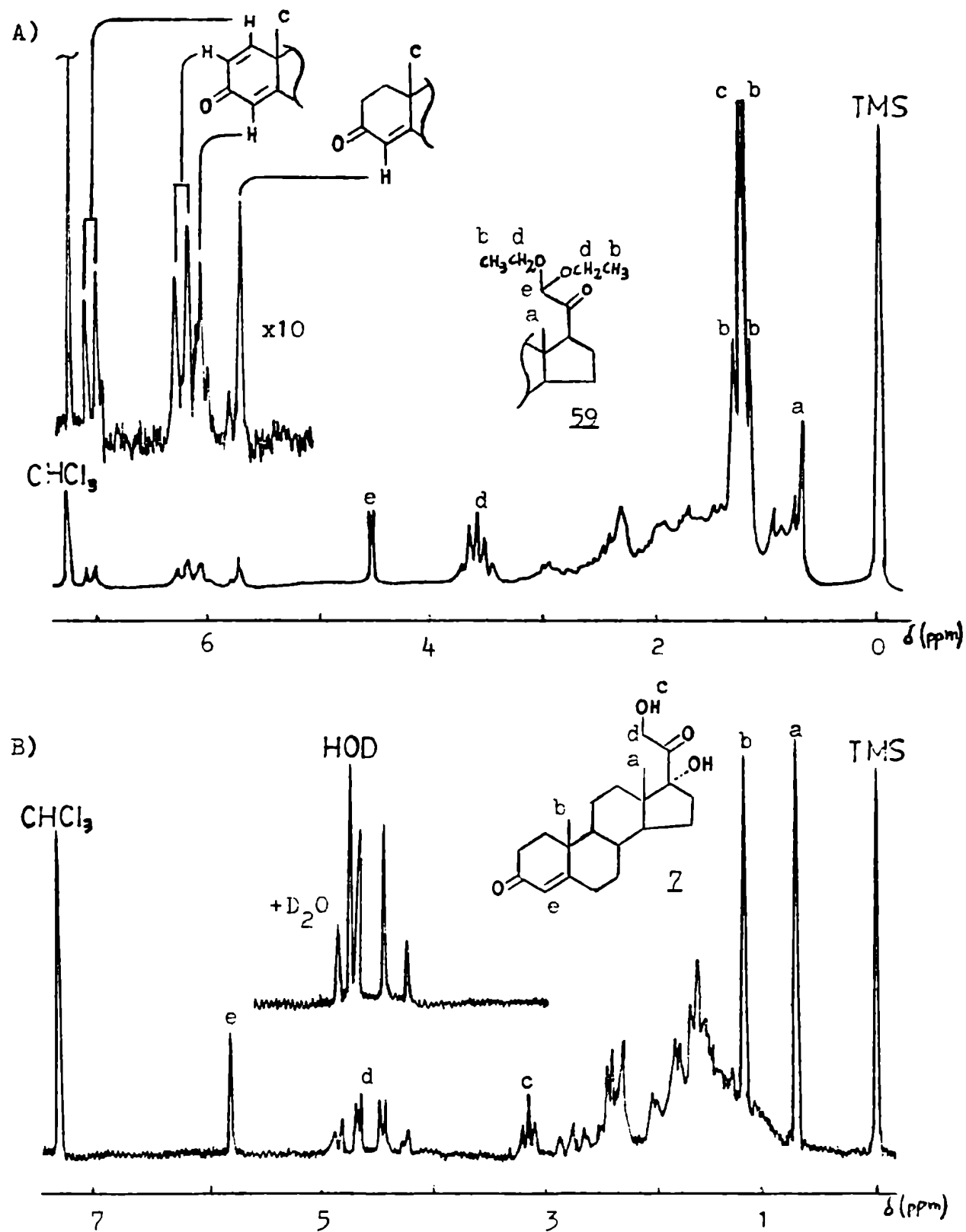


Figura 16: Espectros RMN-<sup>1</sup>H de: A) Producto de oxidación con DDQ e hidrólisis ácida de 17 $\alpha$ ,21-diacetoxiprogesterona.

B) Cortisolona (7).



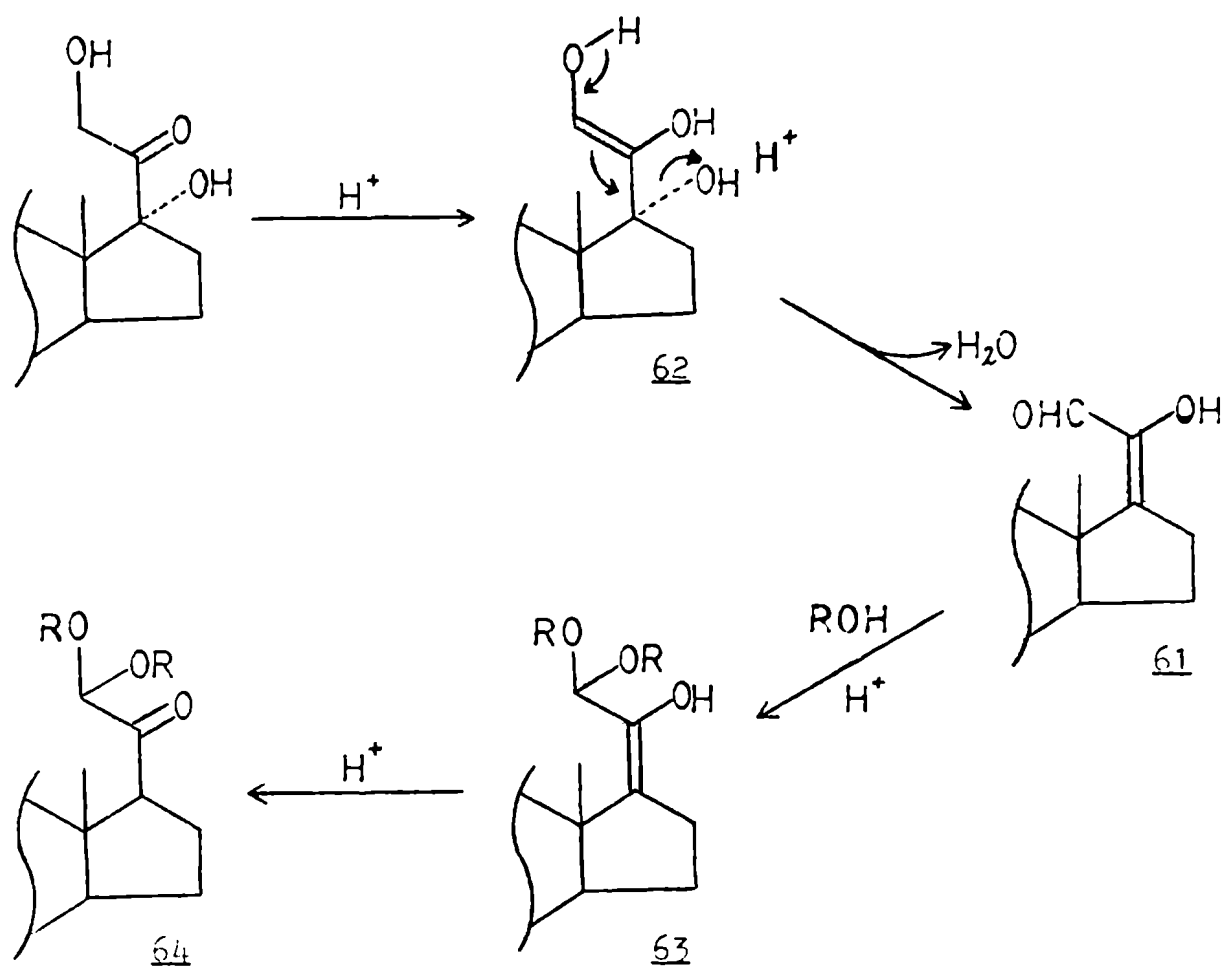
plete a  $\delta$  3,60 ppm ( $J=6\text{Hz}$ ). Además aparece un triplete a  $\delta$  1,24 ppm ( $J=6\text{Hz}$ ). Estas señales indican la estructura propuesta donde el triplete corresponde a los metilos de los etoxilos-21, mientras que el doblete a campos más bajos corresponde al H21, acoplado con el H17 ( $^4J=2\text{Hz}$ ) a través del carbonilo-20. En cuanto al quintuplete, este en realidad se trata de dos cuartetos de  $J=6\text{Hz}$ , desplazados entre si por 6 Hz, los cuales al superponerse producen la distribución observada, correspondiendo cada cuarteto al metileno de un etoxilo-21.

La presencia de las señales correspondientes al metilo-18 a campos donde aparece la misma en el 20-cetopregnano confirma que el carbonilo-20 se encuentra presente como tal.

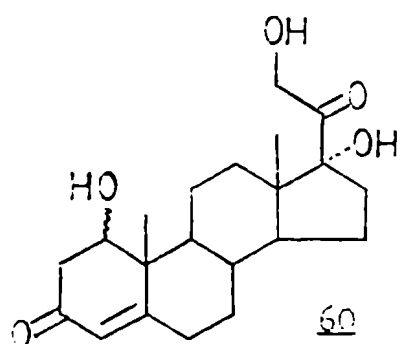
El metoxiderivado correspondiente a la estructura propuesta fue descrito por Mattox <sup>64</sup> en un estudio de la acción del ácido clorhídrico metanólico sobre esteroides con una cadena lateral del tipo  $\alpha,\alpha$ -dihidroxicetona. El mecanismo propuesto se esquematiza en la figura 17.

Hershberg y colaboradores <sup>37,65</sup> durante estudios de deshidratación en ácido acético glacial caliente de 1,17 $\alpha$ ,21-trihidroxipregn-4-en-3,20-diona (60) para la preparación de  $\Delta^1$ -cortexolona (15) observaron la formación del  $\Delta^{17}$ -20-hidroxi-21-aldehído derivado (61) mencionado como intermediario en el esquema de la figura 17.

La inestabilidad en medio ácido del sistema 17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-20-ceto justificaría los resultados poco satisfactorios observados en la hidrólisis de los bismetilendioxi y bencilidendioxi derivados de  $\Delta^1$ -cortexolona mencionados anteriormente.



**Figura 17:** Formación de 21,21-dialcoxi-20-cetoesteroides a partir de 17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-20-cetopregnanos.



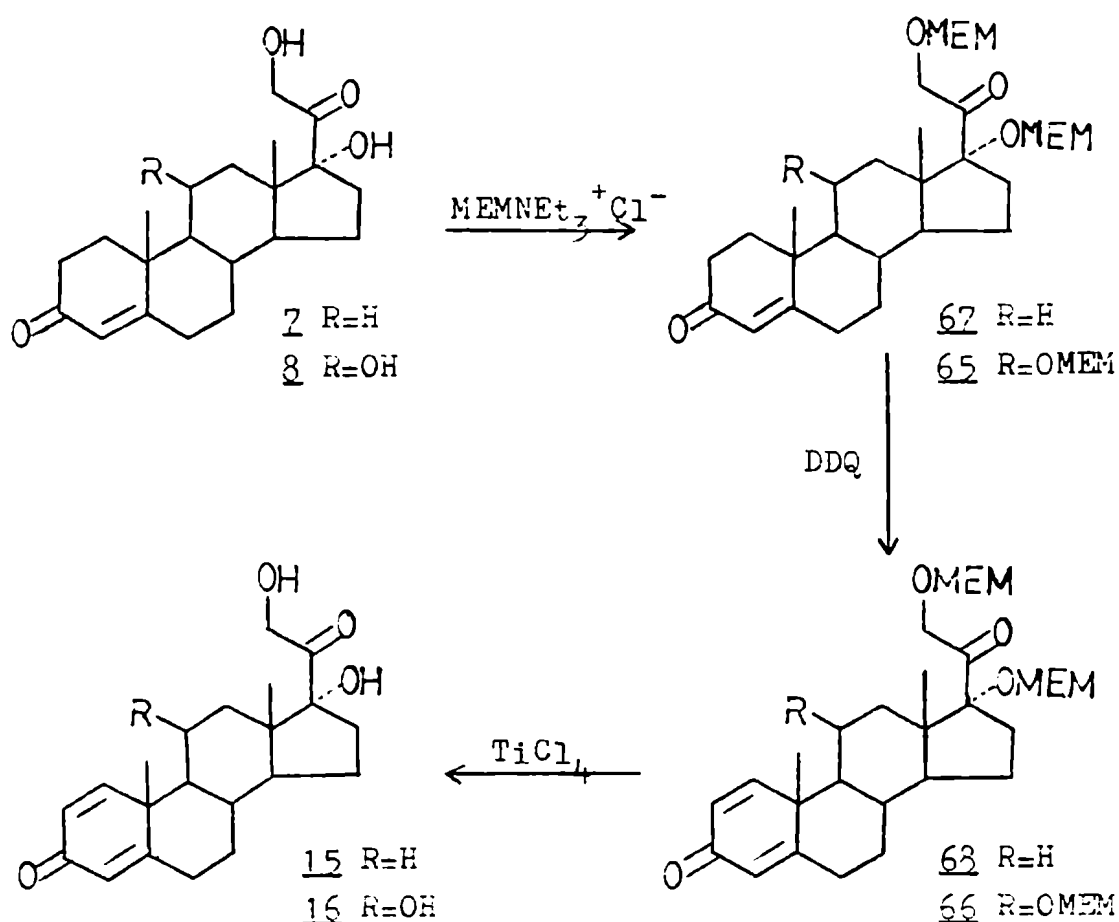
Dada la poca estabilidad de la cadena lateral de cortexona (2) frente a ácidos <sup>37</sup> y bases <sup>36</sup> se decidió ensayar un protector que no requiriese de hidrólisis para su eliminación. Se eligió la protección por formación de un éter con metoxietoximetilo, el cual puede ser eliminado por tratamiento con  $\text{TiCl}_4$  <sup>56</sup>.

La reacción fue ensayada también con cortisol (8), el cual posee la cadena lateral igual a 2.

La protección de 8 se llevó a cabo en las condiciones descritas <sup>56</sup> con buen rendimiento (80 %)(compuesto 65, figura 18). La conversión del mismo en el 1,2-deshidroderivado por oxidación con DDQ se logró en proporción aceptable (75 %)(compuesto 66, figura 18). También la reacción del cloruro de trietil(metoxietoximetil)amonio con 2 dió como resultado el compuesto protegido deseado 67, cuya reacción con DDQ (del producto sin purificar) produjo la oxidación en posición 1,2 con muy buen grado de conversión (90 %)(compuesto 68, figura 18), observándose una muy pequeña proporción del esteroide de partida (analizado por RMN-<sup>1</sup>H).

Finalmente debieron ajustarse las condiciones de hidrólisis del producto lográndose la misma en forma total disolviendo el esteroide en el menor volumen necesario de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , agregando igual volumen de  $\text{TiCl}_4$  a 0°C y procesando luego de 30' de reacción.

Los resultados de las distintas secuencias de síntesis de 17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (15) por oxidación con DDQ del esteroide protegido se resumen, como se indicara anteriormente, en la tabla II-4 (pág. 50).



**Figura 18:** Síntesis de  $\Delta^1$ -cortexolona (**15**) y su 11 $\beta$ -hidroxiderivado (**16**) por oxidación con DDQ de los 1,2-dihidroesteroides correspondientes protegidos como metoxietoximetilderivados (MEM= metoxietoximetilo).

### II.3. Síntesis de esteroides marcados.

#### GENERALIDADES:

Los compuestos marcados con deuterio son una herramienta sumamente útil en la asignación espectral tanto en espectrometría de masa (e.m.) como en resonancia magnética nuclear.

En la e.m. producen el corrimiento de picos correspondientes a las subestructuras que los contienen, lo cual es de gran ayuda para la asignación de las mismas. Además son de suma utilidad en el postulado de mecanismos de fragmentación en los cuales se producen migraciones de hidrógenos desde o hacia la porción cargada <sup>66</sup>.

En la espectrometría de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C (RMN-<sup>13</sup>C) su utilidad en la asignación de espectros está poco explotada <sup>67</sup>. La señal correspondiente a un carbono cuyos hidrógenos fueron reemplazados parcial o totalmente, disminuye en intensidad llegando en algunos casos a desaparecer (ver capítulo III). Por lo tanto, mediante la marcación específica con deuterio de una posición del esteroide puede saberse que señal corresponde a la misma, eliminándose en algunos casos posibles ambigüedades.

Se marcaron con deuterio, por intercambio isotópico, los esteroides pregn-4-en-3,20-diona (1), Pregna-1,4-dien-3,20-diona (9), 17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (11) y 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihidroxi-pregn-4-en-3,20-diona (8) (estructuras en figura 1, pág. 4), con el fin de aprovechar las utilidades expuestas.

Por otro lado, los compuestos marcados con tritio son de suma utilidad en distintos estudios biológicos, como por ejemplo: reconocimiento de órganos y organelas blanco, metabolismo del esteroide, interacción hormona-receptor, etc.

En el estudio sobre la correlación estructura-actividad glucocorticoide, se encontró un esteroide,  $\Delta^1-11\beta$ -hidroxiprogesterona (10), cuyo mecanismo de acción no es el tradicional (ver IV.3. pág. 293). Es así que se planteó la posibilidad de preparar este esteroide marcado con tritio para completar los ensayos biológicos sobre el mismo, requiriéndose desarrollar una secuencia de síntesis con esta finalidad.

Por lo tanto la síntesis de esteroides marcados ensayadas puede dividirse en dos grupos:

- Preparación de compuestos deuterados por intercambio isotópico.
- Desarrollo de una secuencia de síntesis de  $11\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10) fuertemente marcada con  $^3\text{H}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION:

### II.3.1. Deuteración por intercambio isotópico:

La marcación de progesterona (1) con deuterio se realizó en las condiciones básicas de intercambio (Metóxido de sodio en metóxido de deuterio) descritas por Ehadca y colaboradores <sup>67</sup>. Se

obtuvo así un producto homogéneo por cromatografía en capa delgada de  $R_f$  igual a 1, el cual fue utilizado directamente.

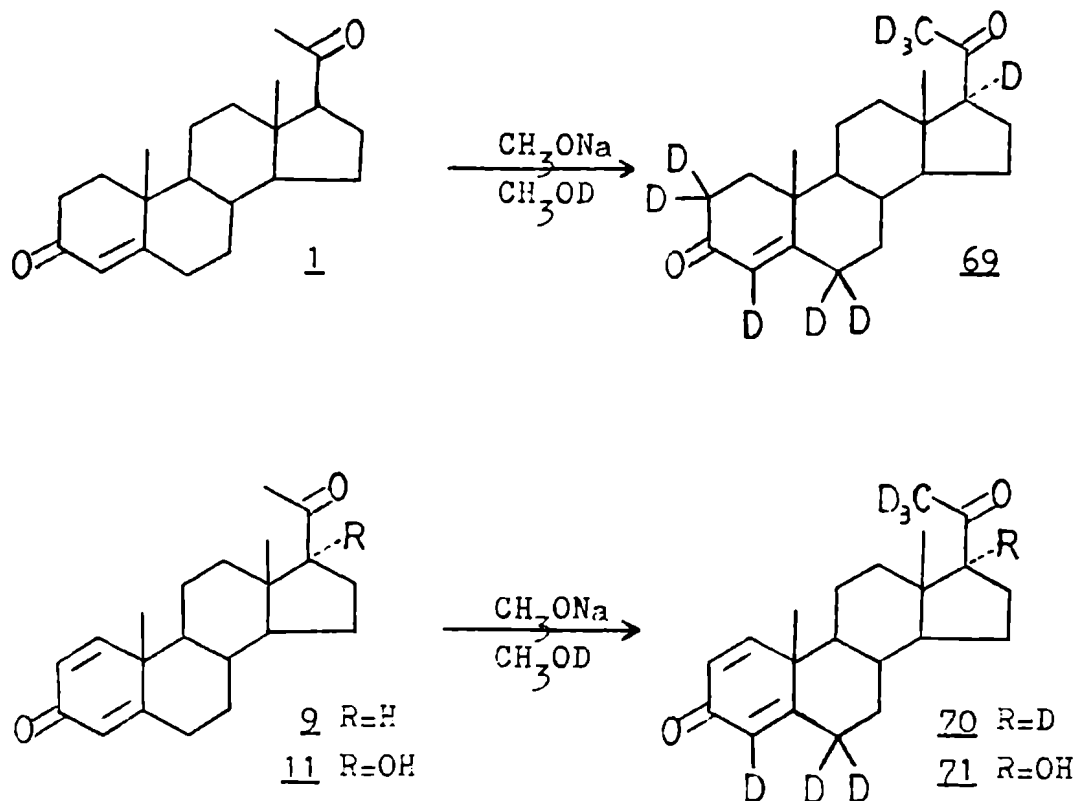
En las condiciones ensayadas se produce el intercambio de los hidrógenos de posiciones 2, 4, 6,  $17\alpha$  y 21 del esteroide, no observándose isomerización de la cadena lateral (figura 19).

El análisis por e.m. del producto indicó los siguientes porcentajes de deuteración: 15 %  $d_9$ ; 37 %  $d_8$ ; 30 %  $d_7$ ; 14 %  $d_6$ ; 4 %  $d_5$ , en notable concordancia con lo observado por los autores anteriormente mencionados <sup>67</sup>.

En idénticas condiciones se preparó  $\Delta^1$ -progesterona (9) marcada en posiciones 4, 6,  $17\alpha$  y 21 con muy buen rendimiento y pureza. Los porcentajes de deuteración obtenidos (analizados por e.m.) fueron los siguientes: 4 %  $d_7$ ; 28 %  $d_6$ ; 29 %  $d_5$ ; 24 %  $d_4$ ; 10 %  $d_3$ ; 3 %  $d_2$  (figura 19).

Como puede apreciarse, el grado de intercambio fue menor que en el caso de progesterona (1). El doble enlace adicional respecto de 1 impide la enolización hacia el C2 (no es posible que el doble enlace se corra hacia el C10 cuaternario). Por lo tanto no es posible el intercambio del hidrógeno de C2. Además ese doble enlace adicional disminuye la enolización hacia C6 debido a la formación de un sistema de conjugación cruzada con el carbonilo como centro del mismo.

Para la obtención de  $\Delta^1$ - $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (11) marcada se procedió de igual manera que en el caso de la deuteración de 1 y 9 (figura 19). Se obtuvo un producto homogéneo por cromatografía en capa delgada ( $R_f$  igual al compuesto de partida) que por e.m. resultó poseer los siguientes porcentajes de deuteración: 5 %



**Figura 19:** Marcación con deuterio de progesterona (1),  $\Delta^1$ -progesterona (2) y  $\Delta^1$ -17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (11) por intercambio isotópico en medio básico.

$\text{d}_6$ ; 30 %  $\text{d}_5$ ; 17 %  $\text{d}_4$ ; 42 %  $\text{d}_3$ ; 6 %  $\text{d}_2$  (figura 19).

El cálculo de los porcentajes de deuteración sobre C21, como se discute en el capítulo III (pág. 164), indicó que el 87 % de las moléculas poseían tres deuterios en dicha posición, mientras que el resto se encontraban dideuteradas. Esta relación es comparable a la obtenida en el caso de 70 (75 % y 25 % respectivamente) lo cual indica que la presencia de un hidroxilo sobre C17 no afec



tá mayormente la enolización del carbonilo-20 hacia C21.

Bhacca y colaboradores <sup>67</sup> describieron la síntesis de cortisol (8) deuterado por intercambio en medio básico a temperatura ambiente (figura 20). Los autores indicaron que el intercambio por deuterio en dioxano/etóxido de deuterio/óxido de deuterio al cual se le agregó metóxido de sodio producía una mezcla de dos productos de la cual se separaba (por recristalización) el esteroide marcado con un rendimiento del 30 %.

El sistema empleado es equivalente a una mezcla de dioxano/etóxido de deuterio/deuteróxido de sodio (1,1 N en óxido de deuterio) y una pequeña proporción de metóxido de deuterio (correspondiente a la hidrólisis del metóxido de sodio). Por lo tanto se ensayó la reacción directamente utilizando la mezcla anterior despreciando la pequeña porción de metóxido de deuterio.

El intercambio se ensayó tanto con 8 como con su  $\Delta^1$ -derivado (16) produciéndose en ambos casos la descomposición total de

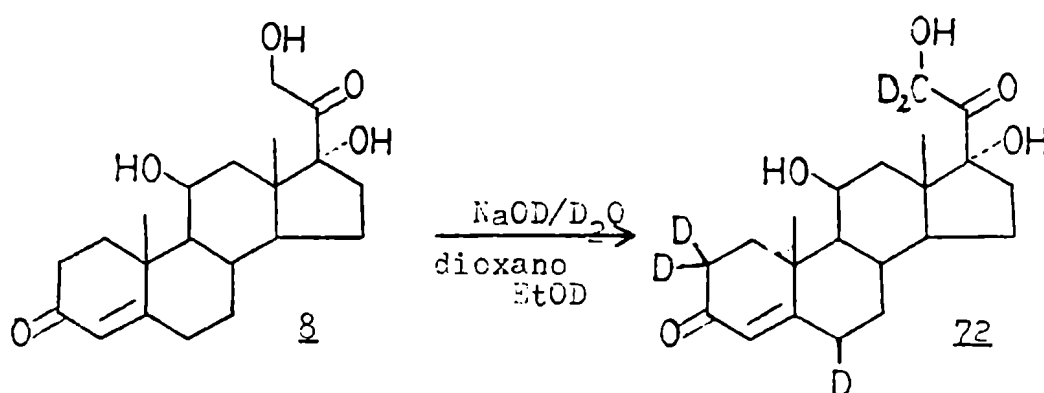


Figura 20: deuteración de cortisol (8) en medio básico (referencia 67).

los corticoides, aún luego de 48 hs (cuando el tiempo de reacción propuesto era de 69 hs).

Entonces se ensayó el intercambio en condiciones ácidas (diglima/cloruro de deuterio/óxido de deuterio) <sup>68</sup> sobre cortisol (8). Se obtuvo así, luego de 86 hs, un producto de  $R_f$  igual al de 8 en cromatografía en capa delgada, acompañado de pequeñas impurezas de mayor  $R_f$ , las cuales se eliminaron por cromatografía en columna.

El análisis por e.m. indicó los siguientes porcentajes de deuteración: 1 %  $d_7$ ; 2 %  $d_6$ ; 19 %  $d_5$ ; 43 %  $d_4$ ; 27 %  $d_3$ ; 7 %  $d_2$ ; 1 %  $d_1$  (figura 21).

La comparación de los espectros de RMN-<sup>13</sup>C del cortisol sometido a la deuteración durante 16 hs y 86 hs (figura 22) aportó información acerca del orden en que se produjo la entrada de deuterios. En el espectro de RMN-<sup>13</sup> luego de 16 hs de reacción se observa la disminución de las señales correspondientes a C4 y C6 lo cual

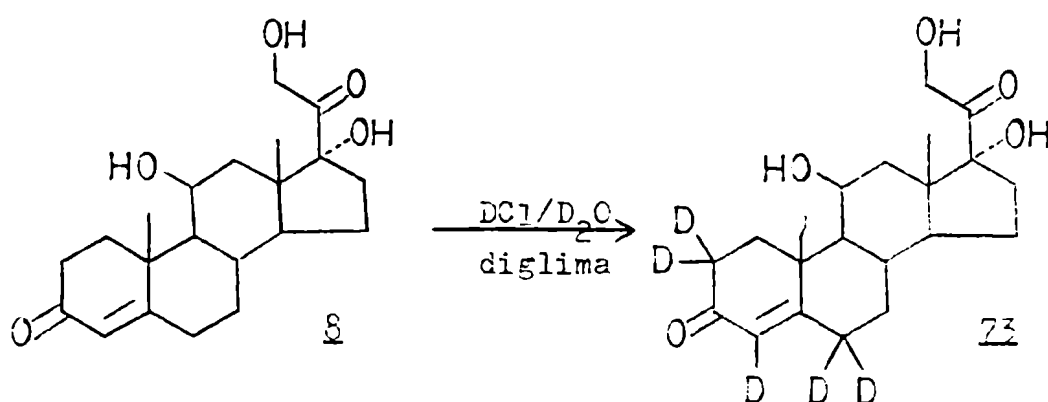


Figura 21: deuteración de cortisol (8) en medio ácido.

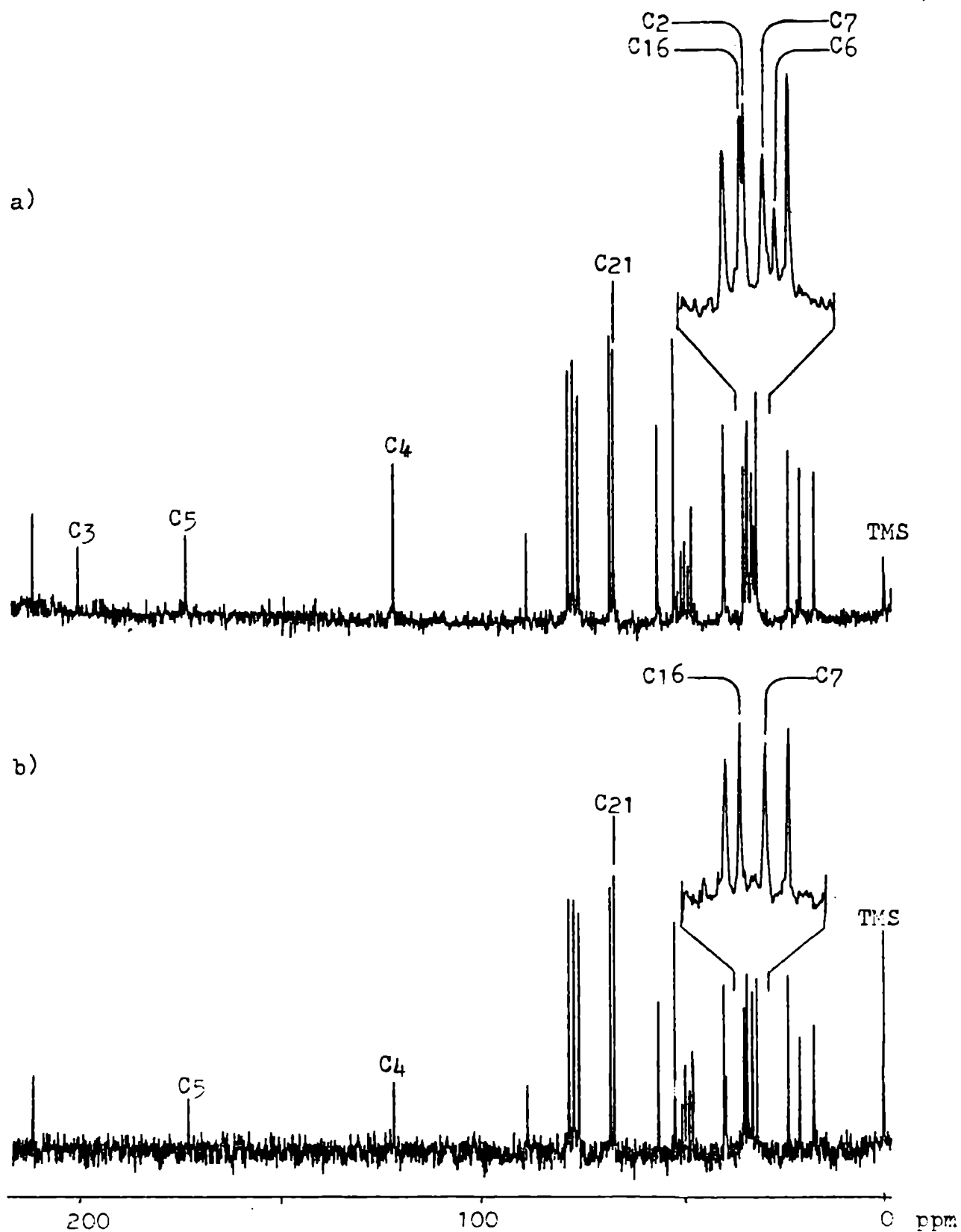


Figura 22: Seguimiento de la deutración de cortisol (8) en medio ácido por RMN- $^{13}\text{C}$ ; a) 16 hs de reacción; b) 36 hs de reacción.

indica su deuteración. Luego del tiempo total de intercambio desaparecieron las señales de C6 y C2 y disminuyó notablemente la de C4. Por lo tanto el sistema  $\Delta^4$ -3-ceto se enolizaría inicialmente hacia C6 con preponderancia sobre C2 (control termodinámico), produciendo el intercambio de los hidrógenos de dicha posición y, con menor eficacia, de posición 4. Con mayor lentitud se produce la deuteración sobre la posición 2 aunque también con mucha eficacia ya que finalmente se produjo la desaparición de la señal de C2 (figura 22).

Por otro lado la deuteración sobre C21 fue escasa (aún luego de los dos intercambios) ya que la intensidad de la señal correspondiente prácticamente no se modificó (figura 22), confirmado por e.m.. Esto resulta lógico dado que el intercambio de los hidrógenos de C21 implicaría la enolización del carbonilo-20 hacia esa posición con lo cual se formaría el sistema 20-insaturado-trihidroxilado 62 (figura 17, pág. 58), descrito por Mattox <sup>64</sup> y posteriormente por Hershberg <sup>37</sup> a través del cual se produce la descomposición de la cadena lateral  $\alpha,\alpha$ -dihidroxicetónica (posiblemente las impurezas observadas en el producto crudo proviniesen de esa reacción lateral).

Comparados el grado de deuteración de los anillos A y B obtenidos en este caso con la marcación de progesterona en la misma región del esteroide (calculadas como se discutirá en el capítulo III, pág. 164) se observó que la marcación de este último (realizada en condiciones básicas) fue algo mayor que en este caso (4,0 deuterios por molécula de 69 frente a 3,7 de 73) lo cual confirma la mayor eficiencia de las condiciones básicas de intercambio sobre las ácidas <sup>69</sup>.

$\Delta^1$ -cortisol (16) sometido a las condiciones ácidas de intercambio no se deuteró aún luego de períodos más prolongados de intercambio (16+70+96 hs). Este hecho estaría de acuerdo con lo observado en la oxidación con DDQ de sistemas  $\Delta^4$ -3-ceto, donde dicho reactivo produce la deshidrogenación en posición 1,2 a través del 2,4-dien-3-ol (29) (figura 5, pág. 30), mientras que el  $\Delta^1,4$ -3-ceto esteroide formado no se enoliza hacia C6 para dar el  $\Delta^1,4,6$ -3-cetoesteroide <sup>39</sup>.

Como se discutiera anteriormente, la marcación de  $\Delta^1$ -progesterona (9) en condiciones básicas se logró en menor proporción que en el caso de progesterona (1), atribuyéndose este resultado a la menor capacidad de enolización del sistema  $\Delta^1,4$ -3-ceto respecto del  $\Delta^4$ -3-ceto por ser un sistema de conjugación cruzada. En condiciones menos favorables para el intercambio (y por lo tanto más selectivas) como es el medio ácido esa menor enolizabilidad influye drásticamente en la reacción, anulándola.

### II.3.2. Secuencia de síntesis apta para la preparación de 11 $\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10) fuertemente marcada:

Para la obtención de 11 $\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10) marcada fuertemente con tritio se planeó inicialmente utilizar la secuencia de síntesis esquematizada en la figura 23.

Para ello se requería estudiar tanto la síntesis del  $\Delta^1,6$ -esteroide como la posterior hidrogenación selectiva (de ser esta posible) para luego realizar la trititación en iguales condi-

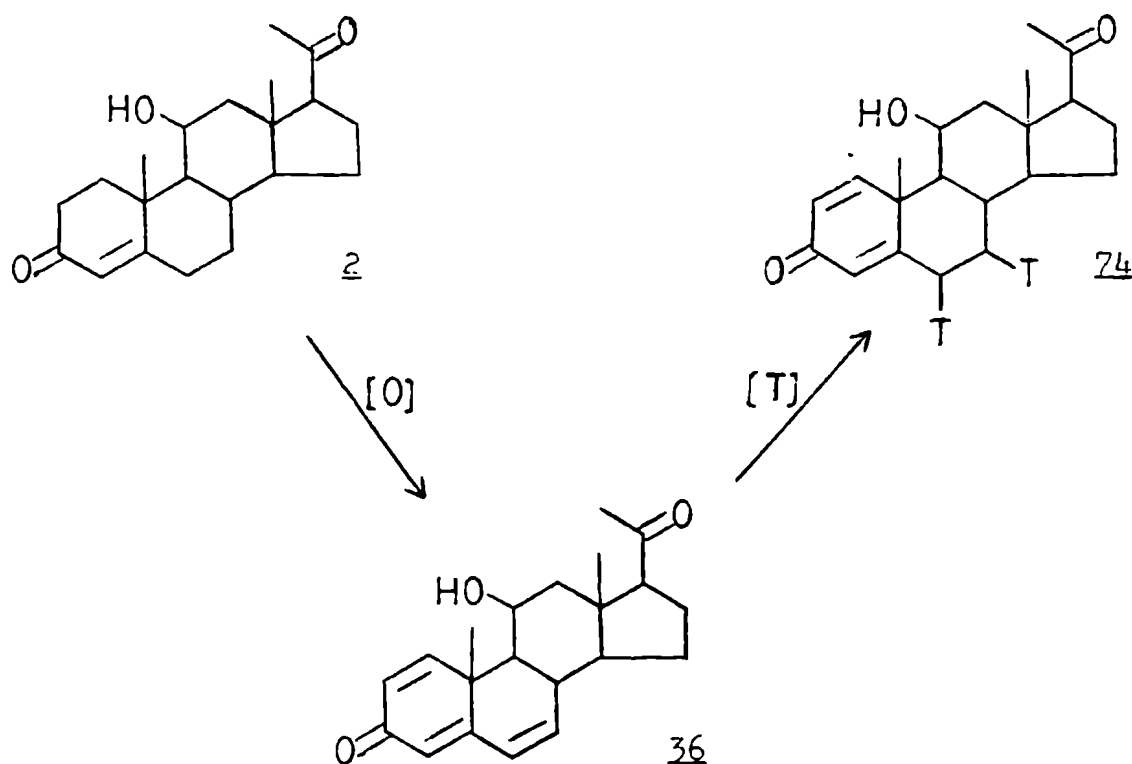


Figura 23: Esquema de síntesis de  $\Delta^1$ -11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (10) fuertemente tritiada a través de  $\Delta^1,6$ -11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (36).

ciones (en este caso por algún organismo idóneo para el manejo de  $^3\text{H}_2$  puro).

La ventaja de esta secuencia, además de su simplicidad, es que se produce la marcación en el paso final de síntesis, evitándose así el posterior manipuleo del esteroide marcado.

La búsqueda de condiciones se realizó previamente utilizando pregnenolona (25) como esteroide de partida, debido a su me

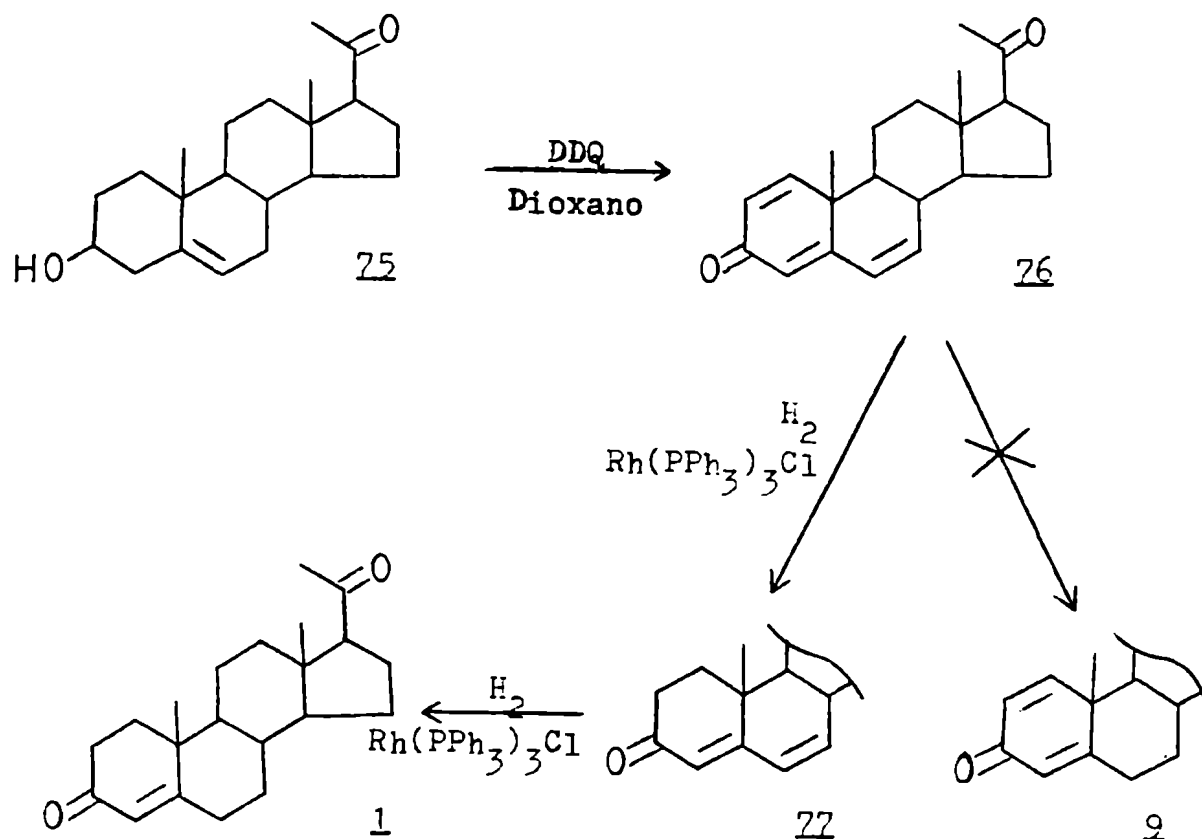
nor costo y mayor disponibilidad, obteniéndose los 11-desoxiesteroi des correspondientes.

La síntesis de  $\Delta^{1,6}$ -progesterona (76) <sup>70</sup> se logró utilizando DDQ como oxidante, en dioxano a reflujo (figura 24). La presencia de un doble enlace 5,6 favorece la enolización de la cetona, que se forma por oxidación del hidroxilo-3, hacia C4, dando el 3,5-dien-3-ol (30), y su oxidación obteniéndose el  $\Delta^{4,6}$ -3-cetoesteroide, el cual luego se oxida al trienderivado. En cambio cuando se parte de un  $\Delta^4$ -3-ceto esteroide, la enolización cinéticamente favorecida se produce hacia C2 dando el 2,4-dien-3-ol (29) y a través de él, el  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto esteroide (ver estructuras correspondientes en figura 5, pág. 30).

El producto obtenido resultó ser una mezcla del esteroide buscado (76) y el de partida (75) en relación 2:1, los cuales fueron facilmente separados. También se observó una muy pequeña cantidad del  $\Delta^{4,6}$ -3-cetoesteroide (77) intermediario (figura 24).

Para la hidrogenación de  $\Delta^{1,6}$ -progesterona (76) se eligió como catalizador al cloruro de rodio tris(trifenilfosfina)  $\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}$  ya que en condiciones controladas (1 atmósfera, temperatura ambiente) permite reducir dobles enlaces 1,2 ó 6,7 sin alterar el sistema  $\Delta^4$ -3-ceto <sup>71</sup>. No existe información respecto de la reactividad relativa de dichos dobles enlaces.

Cuando se ensayó la reacción con 76 se obtuvo al cabo de 24 hs una mezcla (1:1) de progesterona (1) y su  $\Delta^6$ -derivado (77), no observándose señales del esteroide de partida ni del  $\Delta^1$ -esteroide deseado (9). Prolongando el tiempo de reacción a 48 hs se obtuvo exclusivamente 1 (figura 24).



**Figura 24:** Aplicación de la secuencia de síntesis propuesta en la figura 23 a pregnenolona (**75**).

Por lo tanto la reactividad de los dobles enlaces involucrados sería:

$$\Delta^1 > \Delta^6 \gg \Delta^4$$

en el caso de los derivados de progesterona (**1**), siendo imposible entonces la reducción del doble enlace 6,7 en presencia de una insaturación 1,2 sin afectar esta última, utilizando el catalizador mencionado.

Catalizadores heterogéneos como por ejemplo Pd/C fueron



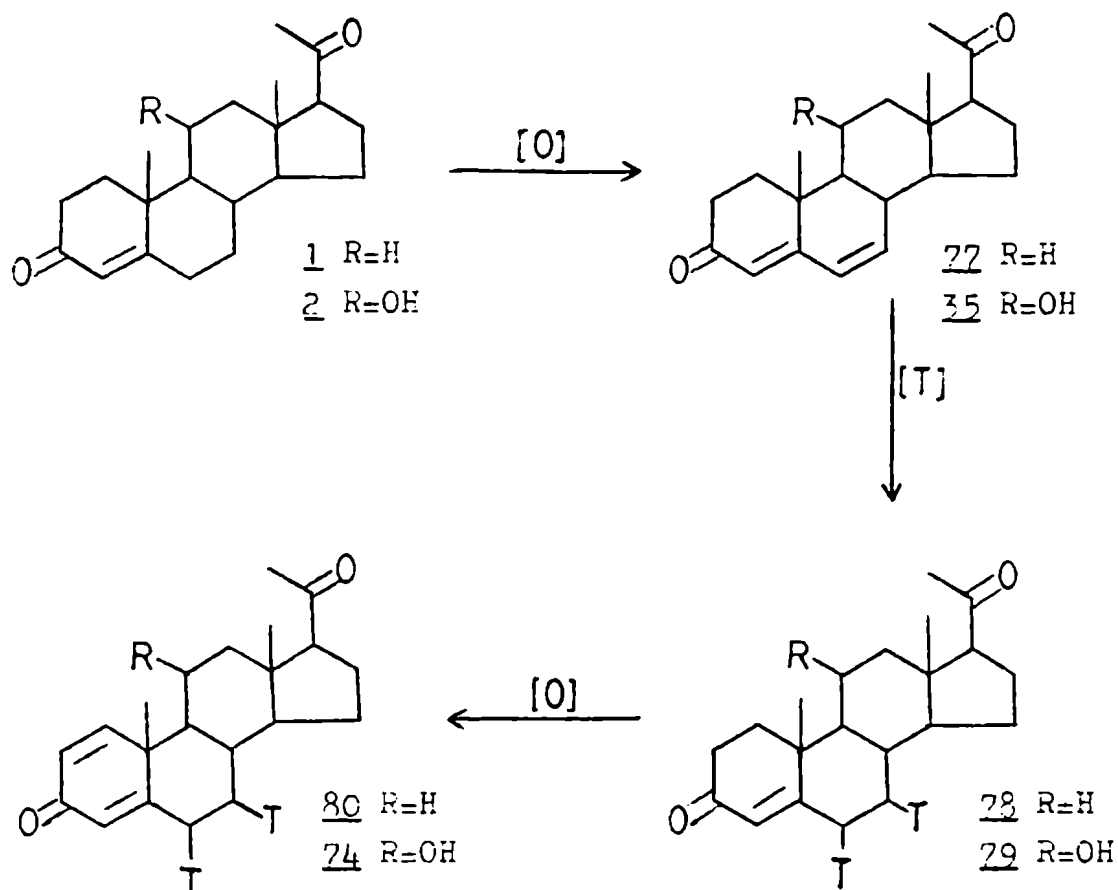
utilizados por distintos investigadores para la reducción de  $\Delta^{4,6}$  y  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroides <sup>72,73</sup> a sus  $\Delta^4$ -3-cetoderivados. La reacción debía ser detenida luego del consumo de 1-1,2 equivalentes de hidrógeno, obteniéndose una mezcla de esteroides formada por el compuesto de partida, el  $\Delta^4$ -3-cetoesteroide deseado y el 4,5-dihidroderivado correspondiente. Además se desconoce la reactividad relativa de los dobles enlaces mencionados. Por las dificultades mencionadas es que no se ensayó con este tipo de catalizadores, prefiriéndose cambiar la estrategia de síntesis por la secuencia de la figura 25.

Nuevamente se ensayó primero la secuencia con los 11-desoxiesteroides correspondientes.

La síntesis de pregna-4,6-dien-3,20-diona (77) se logró mediante la utilización de otra quinona, la 2,3,5,6-tetracloro-benzoquinona (cloranilo). Este reactivo produce la oxidación específica en posición 6,7 del esteroide, lo cual se debe a la imposibilidad de sustraer el hidrógeno de posición 1 del enol cinéticamente favorecido (2,4-dien-3-ol) a diferencia de la DDQ, debido a su menor potencial redox, reaccionando por lo tanto con el H6 del 3,5-dien-3-ol, que se forma por control termodinámico. El reactivo, al igual que la DDQ no afecta el hidroxilo de posición 11 $\beta$  <sup>74,75</sup>.

La reacción de progesterona (1) con cloranilo produjo el esteroide esporado (77) con buen rendimiento (65 %) el cual fue hidrogenado utilizando  $\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}$  como catalizador en las condiciones de reacción ensayadas para  $\Delta^{1,6}$ -progesterona (76). Al cabo de 48 hs de reducción se obtuvo 1 como único producto.

Se completó así el ensayo de la secuencia de síntesis de  $\Delta^1$ -progesterona marcado ya que el último paso (deshidrogenación 1,2)



**Figura 25:** Esquema de síntesis de  $\Delta^1$ -11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (10) y su 11-desoxiderivado (9) fuertemente tritiadas a través de los  $\Delta^6$ -esteroides correspondientes.

ya había sido realizado con anterioridad (II.2.1., pág. 34).

Por lo tanto, mediante esta secuencia de síntesis y reemplazando el  $^1\text{H}_2$  utilizado por  $^3\text{H}_2$ , sería posible obtener  $\Delta^1$ -progesterona fuertemente marcada (80) (hasta dos átomos de  $^3\text{H}$  por molécula) (figura 25).

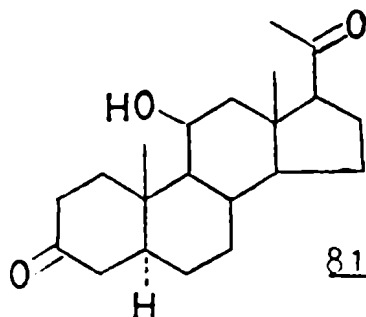
La preparación de 11 $\beta$ -hidroxi-pregna-4,6-dien-3,20-diona (35) a partir del 6,7-dihidroesteroide correspondiente (2) en las

condiciones empleadas anteriormente para la síntesis de  $\Delta^6$ -progesterona (77), se encuentra descripta en literatura <sup>76</sup>. Esta se desarrolló sin inconvenientes.

El análisis por RMN-<sup>1</sup>H del producto de reacción indicó la presencia de trazas del  $\Delta^1$ -esteroide (10) el cual no se observó en el caso del 11-desoxiesteroide (77).

Cuando se intentó hidrogenar el  $\Delta^6$ -11 $\beta$ -hidroxiesteroide (35) en las condiciones utilizadas para el derivado de progesterona, se obtuvo como resultado, al cabo de 55 hs, una mezcla del esteroide de partida, 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona y 11 $\beta$ -hidroxipregnan-3,20-diona (81). en relación 1:2:1.

La bibliografía referente a la hidrogenación de  $\Delta^{4,6}$ -3-cetoesteroides con el catalizador de rodio <sup>71,77</sup> indica que es posible hidrogenar el doble enlace 6,7 sin afectar mayormente la posición 4,5, pero que si el tiempo de reacción se prolonga, se produce luego el ataque a esta última posición. Esto se debe a que ambas posiciones son susceptibles de ser hidrogenadas, pero la posición 6,7 sería más reactiva.



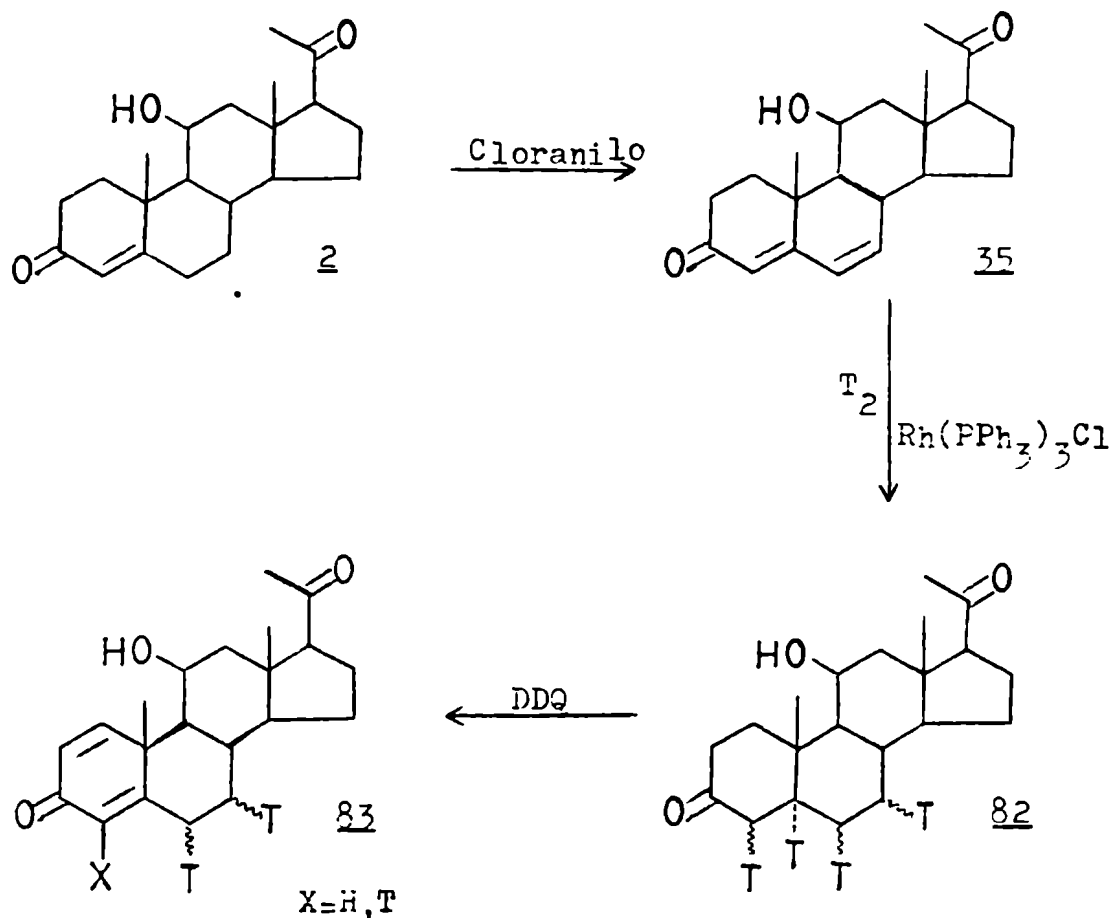
En el caso de  $11\beta$ -hidroxi-pregna-4,6-dien-3,20-diona (35) se hace evidente que la diferencia de reactividad de ambas posiciones disminuye drásticamente. Observando la relación de productos se deduce que la relación de reactividades es apenas de 3:1. Por lo tanto no sería posible obtener el  $\Delta^4$ -3-cetoesteroide como único producto de hidrogenación, utilizando el catalizador de rodio.

Cuando se prolongó el tiempo de hidrogenación a 136 hs se obtuvo como único producto el dihidroesteroide 81 acompañado de trazas de  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2). La configuración del 3-cetoesteroide, exclusivamente  $5\alpha$ , fue determinada por RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ .

La imposibilidad de impedir el ataque del doble enlace 4,5 modificó levemente la secuencia de síntesis de  $11\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10) marcada ya que es posible oxidar 3-cetoesteroides a sus correspondientes  $\Delta^{1,4}$ -derivados, utilizando DDQ como reactivo <sup>39</sup>. Las reacciones descritas al respecto utilizan como solvente dioxano. Sin embargo se decidió utilizar benceno debido a su menor punto de ebullición y mayor selectividad, demostrada en la síntesis de  $\Delta^1$ -17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (11) (II.2.1., pág. 36).

Realizada la reacción se logró, con rendimiento similar al obtenido a partir de  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2), el  $\Delta^1$ -esteroide (10) esperado, observándose éste como único producto, acompañado solo por trazas del compuesto de oxidación intermedio 2.

De trabajarse con  $^3\text{H}_2$  en lugar de  $^1\text{H}_2$  durante la reducción (figura 26) se produciría la marcación en posiciones 4,5,6,7 (compuesto 82). La estereoquímica de la hidrogenación para la catálisis



**Figura 26:** secuencia de síntesis de 11 $\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10) apta para su marcación con  $^3\text{H}$ .

homogénea con  $\text{Rh(PPh}_3)_3\text{Cl}$  indica que se produce entre un 30 y un 67 % de adición cis para ciclohexenos sustituidos <sup>77</sup>. Por lo tanto sería incierta la configuración de los átomos de tritio de las posiciones 4,6,7 (el tritio de posición 5 adoptaría la configuración  $\alpha$ ). En cambio la DDQ produce la eliminación de los hidrógenos trans diaxiales 4 $\beta$ ,5 $\alpha$  <sup>39</sup>, llevándose toda la marca de C5 y parte de la de C4 (solo la de configuración  $\beta$ ). Quedaría entonces la marca de C6, C7 y la de posición 4 $\alpha$  (compuesto 83) (figura 26).

La secuencia descripta permitiría la obtención de 11 $\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10) fuertemente marcada (más de dos átomos de  $^3\text{H}$  por molécula).

#### II.4. Síntesis de 20-metilenesteroides por reacción de Wittig.

##### GENERALIDADES:

En los estudios realizados por RMN- $^{13}\text{C}$  sobre la conformación de la cadena lateral de 20-cetoesteroides  $17\alpha$  y/o 21-hidroxilados que se discuten en el capítulo III (pág. 244), resultaron de suma utilidad los 20-metilenanálogos de los mismos, los cuales debieron ser sintetizados.

Inicialmente se pensó que el método más simple de obtener 20-metilenesteroides era a través de una reacción de Wittig <sup>78</sup> sobre los 20-cetopregnanos correspondientes, utilizando  $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$  como iluro atacante.

Se trabajó con progesterona (1) y su derivado hidroxilado en posición 17. En esos casos era de esperarse que la reacción de Wittig se produjera sobre los dos sistemas carbonílicos presentes. Este hecho no sería inconveniente pues la modificación de un grupo funcional en el anillo A del esteroide no afecta mayormente el comportamiento de las señales correspondientes a los carbonos de la cadena lateral del mismo.

Posteriormente se eliminó el sistema  $\Delta^4$ -3-ceto de los esteroides anteriormente mencionados, previamente a la reacción de Wittig, por razones que se discuten más adelante.

Finalmente se ensayó la reacción de Wittig sobre el 3-benciltioenoleter de progesterona (34) (ver estructura en figura 29, pág. 86).

## RESULTADOS Y DISCUSION:

Comenzando con el esteroide más simple de la serie inicial se realizó la reacción de Wittig sobre progesterona (1), obteniéndose con muy buen rendimiento el dimetilen derivado 35 (figura 27).

Este producto fue fácilmente purificado por cromatografía en columna ya que, dada su muy baja polaridad, se eluyó con hexano, quedando retenidas todas las impurezas.

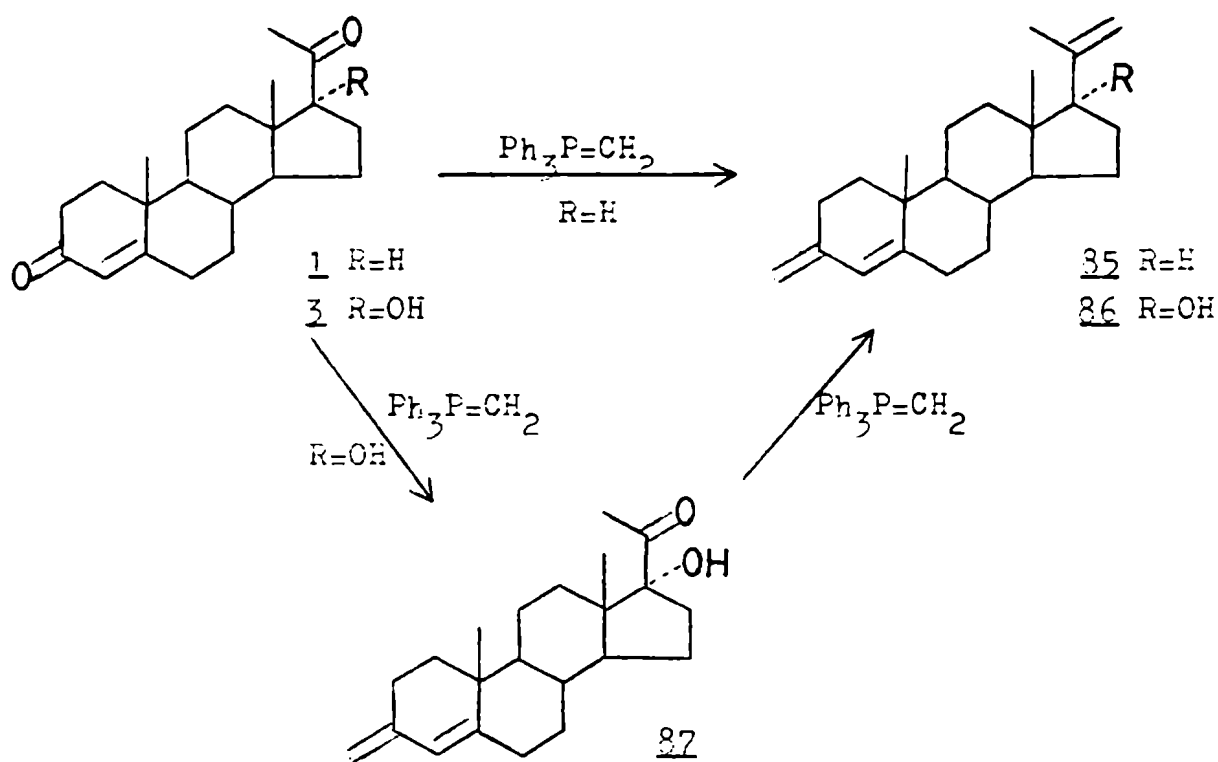


Figura 27: Reacción de Wittig sobre progesterona (1) y su 17 $\alpha$ -hidroxiderivado (3).



Esto resultó sumamente ventajoso ya que debió trabajarse rápidamente debido a la poca estabilidad del esteroide, el cual se descompone a temperatura ambiente en contacto con el aire, dando una compleja mezcla de sustancias más polares. Por esta razón debió ser guardado bajo atmósfera de nitrógeno a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La inestabilidad del esteroide formado reside principalmente en el sistema conjugado del anillo A el cual, por ejemplo, sufre reacciones de isomerización (espontánea o acelerada por catálisis ácida) <sup>79</sup>.

Cuando se intentó sintetizar el  $17\alpha$ -hidroxiderivado 86, a partir de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) en iguales condiciones de reacción, se obtuvo como producto mayoritario el 3-metilen-20-ceto esteroide (87). Solo se detectó el compuesto deseado como impureza minoritaria. El producto de reacción 87 fue sometido nuevamente a las condiciones de reacción de Wittig obteniéndose, con bajo rendimiento (5 %) el dimetilenesteroide buscado (86) (figura 27).

Intentos de mejorar el rendimiento de la reacción, por aumento de la proporción de iluro o prolongación del tiempo de reacción, fueron infructuosos pues se produjo la descomposición de los esteroides, debido a la inestabilidad de la funcionalidad del anillo A.

De los tres 3-metilen- $\Delta^4$ -esteroides sintetizados (85, 86 y 87) no se encontró descripción alguna en literatura.

Con el fin de aumentar la estabilidad de los esteroides con los cuales se trabajaba, se decidió eliminar la funcionalidad del anillo A ( $\Delta^4$ -3-ceto el cual por reacción de Wittig produce el

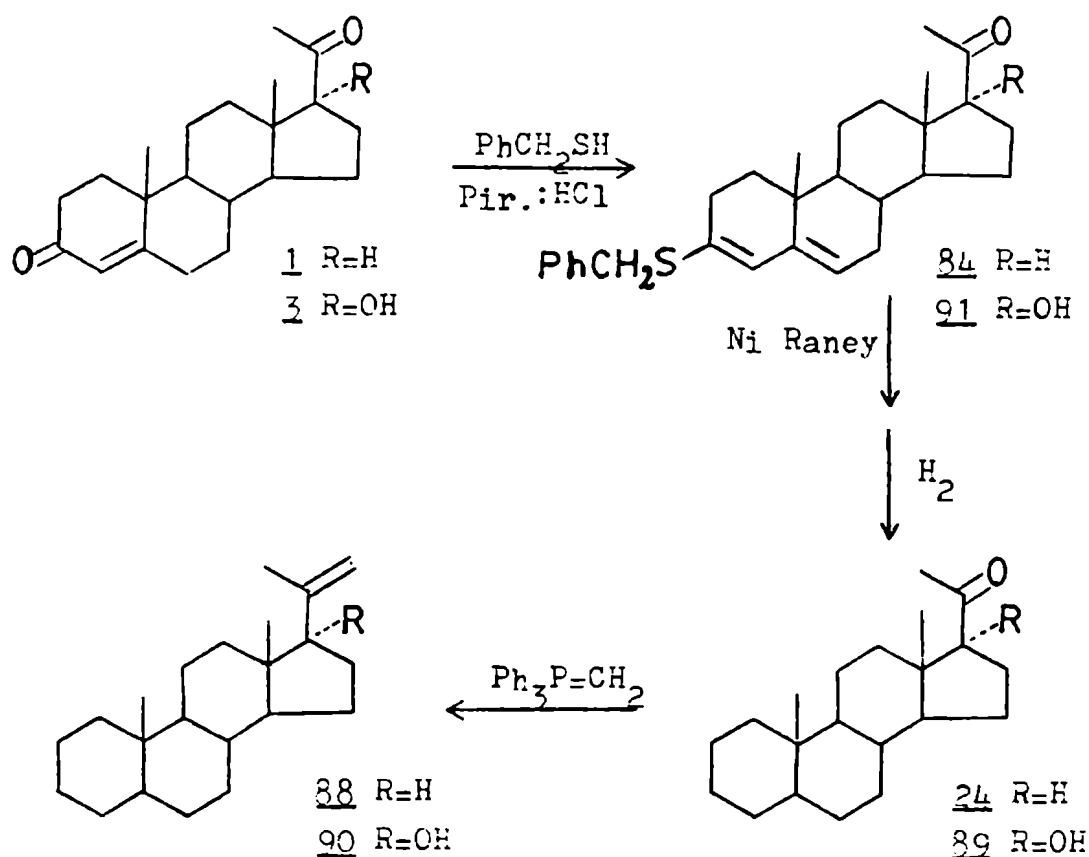
inestable 3-metilen- $\Delta^4$ ), teniendo en cuenta que para los estudios espectroscópicos, para los que se requerían los esteroides, no im portaba la sustitución del anillo A.

Comenzando nuevamente con progesterona (1) se preparó el benciltioenoleter correspondiente (84) <sup>80</sup> el cual fue eliminado con W-2 níquel Raney, obteniéndose una compleja mezcla de 20-cetopreg nanos con distinto grado de insaturación. Dadas las particulares características de este producto, la reacción de eliminación fue estudiada en mayor detalle como se discutirá en II.6. (pág. 96). Las estructuras de los componentes del producto obtenido se resumen en la figura 35 (pág. 99). El producto de eliminación fue hidroge nado utilizando Pd/C como catalizador, obteniéndose el 20-cetopreg nano (24) requerido.

El compuesto 24 fue sometido a la reacción de Wittig en las condiciones empleadas anteriormente, obteniéndose con muy buen rendimiento el 20-metilenesteroide correspondiente (88)(figura 28).

Como era de esperarse el producto obtenido fue mucho más estable que el 3-metilen- $\Delta^4$ -esteroide correspondiente (85), no ob servándose descomposición del mismo a temperatura ambiente.

Del mismo modo se aplicó la secuencia benciltioenoleter-eliminación-hidrogenación sobre 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) para la obtención de 17 $\alpha$ -hidroxi-20-cetopregnano (39),(figura 28) sobre el cual se realizó la reacción de Wittig. Al cabo de la misma se recuperó más del 90 % del esteroide de partida, observándose el pro ducto deseado (90) en forma minoritaria. Nuevos intentos de mejorar la conversión de la reacción fueron infructuosos como en el caso de la 20-metilenación del 17 $\alpha$ -hidroxi-3-metilen-pregn -4-en-20-ona



**Figura 28:** Síntesis esquemática de 20-cetopregnano (24) y su 17 $\alpha$ -hidroxiderivado (89) y reacción de Wittig sobre los mismos.

(87), salvo que en este caso se recuperó el esteroide de partida en lugar de producirse su descomposición.

La tabla II-5 resume los resultados obtenidos en las reacciones de Wittig para los distintos sustratos.

No existen mayormente en literatura trabajos que indiquen la influencia de hidroxilos presentes en la cetona sobre el rendi-

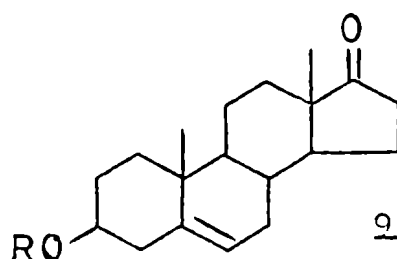
Tabla II-5: Síntesis de metilenesteroides por reacción de Wittig.

Mat. prima (a)	Producto (a)	Rend. % (b)
<u>1</u>	<u>85</u>	85 %
<u>3</u>	<u>87</u>	50 %
<u>82</u>	<u>86</u>	5 %
<u>24</u>	<u>88</u>	80 %
<u>89</u>	<u>90</u>	trazas
<u>84</u>	<u>92</u>	92 %

(a) ver estructuras correspondientes en las figuras 27, 28 y 29.

(b) producto puro aislado.

miento de la reacción. Sondheimer y Mechoulam <sup>79</sup> indicaron que el rendimiento de la reacción de Wittig sobre 3 $\beta$ -hidróxi-androst-5-en-17-ona (93) es mayor cuando se protege el hidroxilo por formación del tetrahidropiraniéter correspondiente (94) (44 % frente a 36 % de rendimiento). Sin embargo las diferencias indicadas resultan poco significativas frente a los casos aquí presentados.



93 R=H

94 R=tetrahidropiraniolo

Es poco probable que el efecto del hidroxilo-17 sobre la reacción de Wittig en C20 sea de tipo estérico ya que el análisis por difracción de rayos X del esteroide <sup>81</sup> indicó que la cadena lateral del mismo se orienta de forma tal que el oxígeno-20 se encuentra hacia la cara  $\beta$  del esteroide, formando un ángulo diedro pequeño con la unión C16-C17, mientras que el hidroxilo se dirige hacia la cara  $\alpha$ . De todos modos el efecto inhibitorio del hidroxilo-17 $\alpha$  sobre la reacción de Wittig se restringe a una región del esteroide cercana al mismo, ya que la reacción sobre el sistema  $\Delta^4$ -3-ceto de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) transcurrió en forma normal.

Debido a los bajos rendimientos observados en la reacción de Wittig con 17 $\alpha$ -hidroxiesteroides, se decidió cambiar el tipo de reacción utilizada para introducir el metileno en posición 20. Para ello se empleó la reacción de los 17 $\alpha$  y/o 21-hidroxi-20-cetosteroides con complejos ( $Zn-CH_2$ ) como se discutirá en el siguiente punto de este capítulo, obteniéndose los  $\Delta^4$ -3-ceto-20-metilenesteroides correspondientes. Sin embargo por ese método no es posible sintetizar el 20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (95), necesario para completar la serie de esteroides requerida para los estudios espectroscópicos sobre la conformación de la cadena lateral que se discute en el capítulo III (pág. 244). Por lo tanto se decidió proteger el carbonilo-3 y emplear la reacción de Wittig sobre C20 ya discutida.

Como protector específico del carbonilo-3 en presencia del de C20 se había ensayado con anterioridad la transformación del mismo en el benciltioenoleter correspondiente (84) <sup>80</sup>. Este protector es estable en medio básico y por lo tanto a las condiciones de

reacción, siendo fácil la regeneración del sistema  $\Delta^4$ -3-ceto por hidrólisis ácida suave.

La reacción de 84 con  $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$  dio como resultado el 20-metilenesteroide (92) correspondiente con un buen rendimiento (tabla II-5, pág. 84), cuya hidrólisis final produjo el 20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (95) (rendimiento global: 70 %) (figura 29).

Está descripta en literatura <sup>21</sup> la síntesis de 95 por reacción de Wittig, utilizando como protector el grupo etilidendioxi. En cambio de 92 no se encontró referencia alguna.

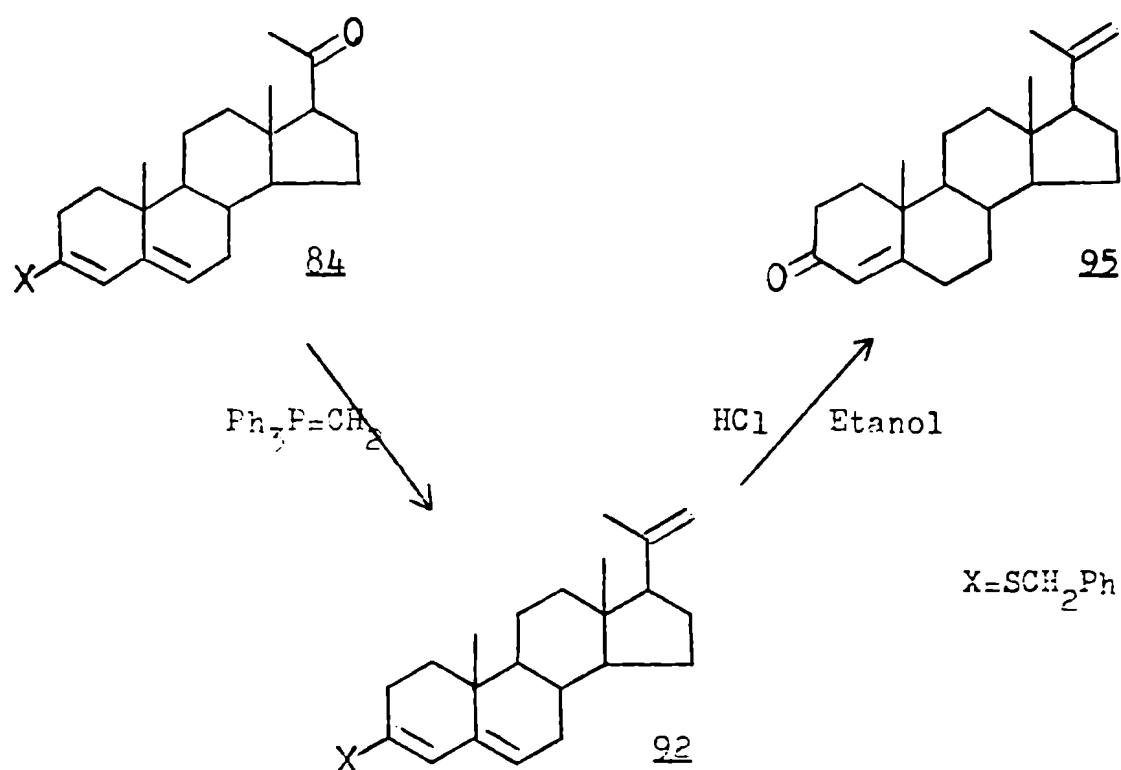


Figura 29: síntesis de 20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (95).

Todos los 20-metilenesteroides sintetizados presentaron la particularidad de tomar una coloración azul cuando se los reveló con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50 %) en cromatografía en capa delgada, sin necesidad de calentamiento. Esta característica sería propia del grupo 20-metileno y no de metilenderivados en general, pues el 3-metilen análogo de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) reveló de color marron, recién luego del calentamiento a 105°C de la placa cromatográfica rociada con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50 %).

## II.5. Síntesis de 20-metilenesteroides por reacción con complejos ( $\text{Zn-CH}_2$ ).

### GENERALIDADES:

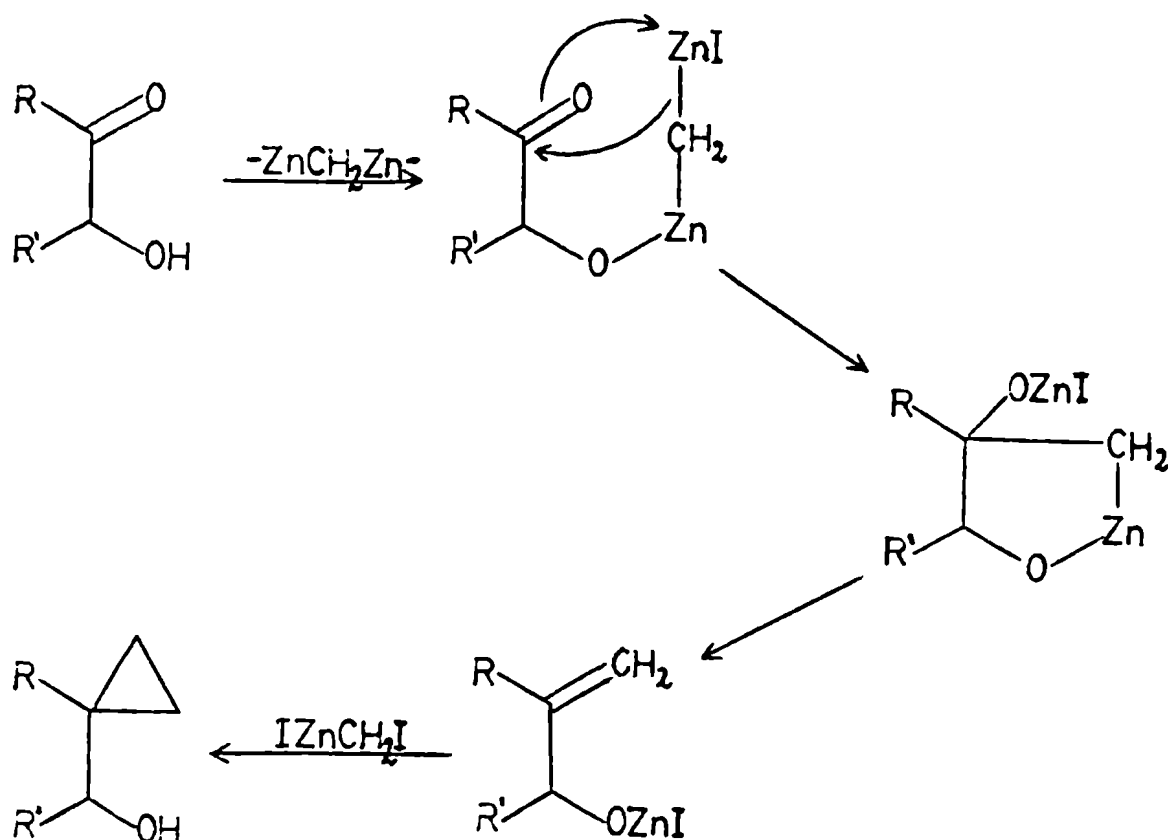
Es bastante conocida la reacción de Simmons-Smith <sup>82</sup> de formación de ciclopropanos a partir de olefinas utilizando la cupla  $\text{Zn(Cu)}$  y  $\text{CH}_2\text{I}_2$  (último paso de la secuencia indicada en la figura 30). El reactivo mencionado puede reaccionar también con cetonas para dar los gem-ciclopropanos correspondientes. En este caso la reacción transcurriría a través del metilenderivado correspondientes, el cual reaccionaría con más reactivo para dar el ciclopropano.

Esta transformación de cetonas en gem-ciclopropanos solo se produce con buen rendimiento cuando existe un grupo hidroxilo en posición  $\alpha$  a la cetona ya que la unión del hidroxilo con el complejo de Zn ubicaría al mismo en posición óptima para el ataque del carbonilo (figura 30).

En el primer ataque se involucra a especies del tipo  $-\text{Zn-CH}_2-\text{Zn}-$  mientras que la conversión final del metilenderivado en el gem-ciclopropano se adjudica a especies del tipo  $\text{I-CH}_2-\text{Zn-I}$ , más reactivas.

El primer tipo de complejos requiere mayor tiempo para su formación, así como también mayor cantidad de Zn. Por lo tanto, preparando el complejo con anterioridad a la reacción y en presencia de exceso de Zn sería posible minimizar la cantidad de complejos del tipo  $\text{I-CH}_2-\text{Zn-I}$ , obteniéndose como producto el metilenderi

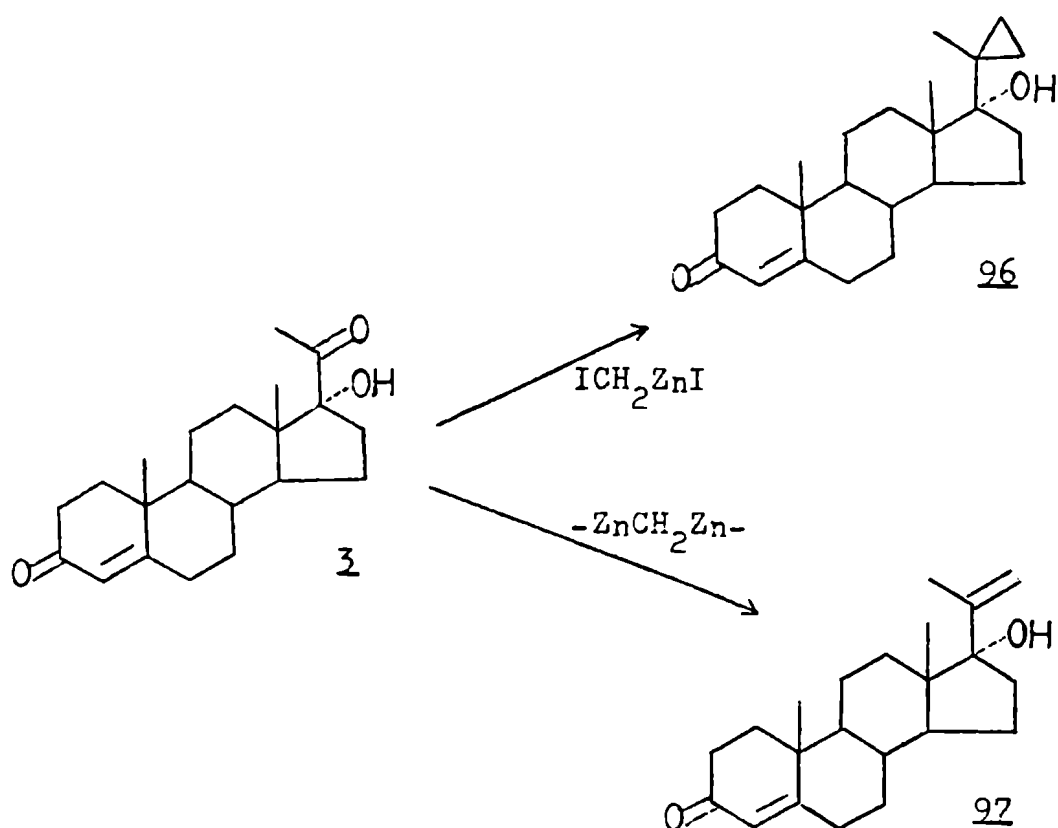




**Figura 30:** Mecanismo de la reacción de Simmons-Smith sobre  $\alpha$ -hidroxicetonas.

vado.

Fried y colaboradores<sup>83</sup> ensayaron la reacción sobre  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (3). Cuando utilizaron el complejo de  $Zn(Cu) + CH_2I_2$  luego de una hora de calentamiento a reflujo en éter etílico, obtuvieron con un 89 % de rendimiento el 20,20-etanoderivado (96) (figura 31). En cambio cuando el calentamiento a reflujo previo se prolongó por 4 hs, el producto aislado con un 93 % de rendimiento fue el 20-metilenesteroide (97) (figura 31).

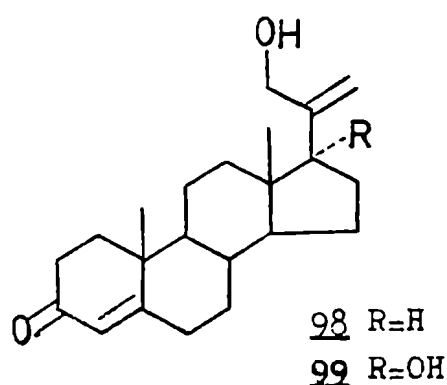


**Figura 31:** Reacción de 17α-hidroxiprogesterona (3) con complejos  $(\text{Zn}-\text{CH}_2)$  obtenidos en distintas condiciones (referencia 83).

La reacción original de ciclopropanación <sup>82</sup> indica que puede utilizarse tanto  $\text{CH}_2\text{I}_2$  como  $\text{CH}_2\text{Br}_2$  como dador del grupo metileno, siendo el primero más efectivo.

Una reacción similar a la anterior pero que utiliza la cupla  $\text{Zn}(\text{Pb})$  en lugar de la  $\text{Zn}(\text{Cu})$ , se encuentra descripta como específica para la preparación de 20-metilenesteroides <sup>84</sup>. En la patente de este método figura la síntesis tanto de 97 como de 20-hi

droximetil-pregna-4,20-dien-3-ona (98), indicándose la posibilidad de utilizar tanto  $\text{CH}_2\text{I}_2$  como  $\text{CH}_2\text{Br}_2$ . En cambio no existen referencias acerca de 17 $\alpha$ -hidroxi-20-hidroximetil-pregna-4,20-dien-3-ona. (99).



El Zn activado en la formación de la cupla con Pb reacciona con el dihalometano para producir el complejo soluble esquematizado en la figura 32, según la reacción estequiométrica que se indica.

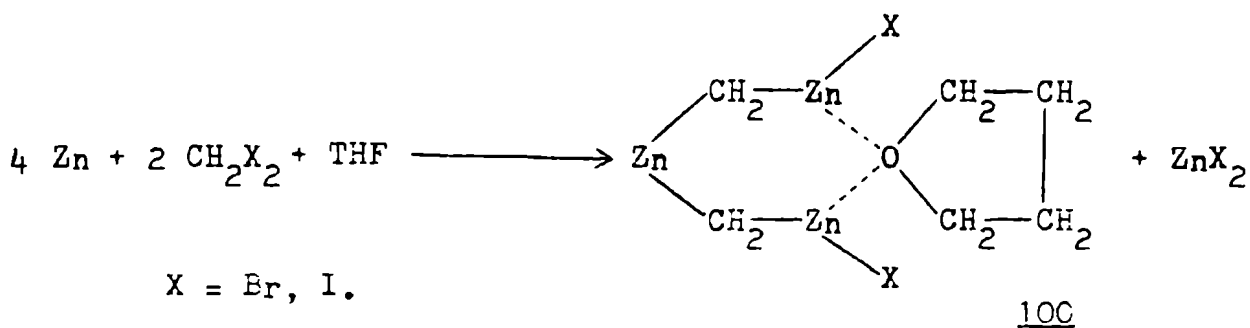


Figura 32: Formación del complejo ( $\text{Zn}-\text{CH}_2$ ) en tetrahidrofurano (THF) utilizando la cupla  $\text{Zn}(\text{Pb})$ .

El complejo 100 posee los grupos  $-\text{Zn}-\text{CH}_2-\text{Zn}-$  capaces de transformar una cetona en el metilenderivado, como se discutiera anteriormente, pero incapaces de atacar el doble enlace formado para dar el gem-ciclopropano.

## RESULTADOS Y DISCUSION:

### II.5.1. Cupla Zn(Cu):

Cuando se calentó a reflujo la cupla Zn(Cu) <sup>85</sup> (polvo gris rojizo) con  $\text{CH}_2\text{Br}_2$  en éter etílico, el precipitado tomó consistencia gomosa. Se procedió al agregado del esteroide (los ensayos se llevaron a cabo con  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (3)), obteniéndose luego de 40 hs el 20,20-etanoderivado (96) con un 50 % de rendimiento.

La determinación de la presencia ó no del ciclopropilderivado en las distintas reacciones ensayadas, durante la puesta a punto del método se llevó acabo por RMN-<sup>1</sup>H. En los espectros se observó una señal a  $\delta$  0,58 ppm, que integraba para cuatro hidrógenos, correspondiente a los metilenos del ciclopropano, mientras que la señal del metilo-21 apareció a  $\delta$  0,99 ppm.

Posteriormente se repitió la reacción utilizando  $\text{CH}_2\text{I}_2$  en éter etílico, obteniéndose nuevamente el gem-ciclopropano 96.

Los resultados se encuentran resumidos en la tabla II-6 (pág. 95).

## II.5.2. Cupla Zn(Pb):

La preparación del complejo ( $\text{Zn-CH}_2$ ) se realizó primero en las condiciones descriptas <sup>84</sup> (1 equivalente de acetato de plomo, 2 equivalentes de Zn y 1 equivalente de  $\text{CH}_2\text{X}_2$ , una hora a temperatura ambiente) utilizando  $\text{CH}_2\text{Br}_2$  ó  $\text{CH}_2\text{I}_2$ .

La solución del complejo 100 se ensayó sobre  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) en cantidades equivalentes y con exceso de reactivo, lográndose en este último caso mejor reproducibilidad y rendimiento global. En ambos casos se obtuvo una mezcla de productos cuyo componente principal era el 20,20-etanoderivado 96, observándose una pequeña cantidad del metilenesteroide 97.

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del ciclopropilesteroide presenta la ventaja de no poseer señales en la región 105-145 ppm, donde absorben los carbonos olefínicos del grupo 20-metilen, por lo cual estos últimos pueden ser fácilmente identificados en una mezcla con el ciclopropilderivado (la señal más notoria de estos es la que aparece a  $\delta$  6,40 ppm correspondiente a uno de los metilenos del ciclopropano).

El resultado anterior indicó la presencia de gran proporción de componentes del tipo  $\text{I-CH}_2\text{-Zn-I}$  de gran reactividad y responsable de la transformación del 20-metilenesteroide 97 en el gemciclopropilderivado 96.

Para desactivar el complejo se decidió dejar más tiempo la mezcla de preparación del complejo (4 hs) a temperatura ambiente antes de la utilización de la solución correspondiente (por similitud a lo propuesto en el caso del complejo  $\text{Zn(Cu)}$ ). En ese ma

por tiempo las formas más activas del complejo se combinarían entre sí, captando más Zn y dando las especies causantes de la metilación, pero imposibilitadas de la reacción posterior.

Ensayadas dichas condiciones se obtuvo como producto principal el 20-metilenesteroide deseado (97), impurificado por el 20, 20-etanoderivado 96, del cual no pudo ser separado.

La impurificación con el gem-ciclopropilesteroide indicó que aún existían restos de la forma activa. Esto podría deberse a que el Zn no fuera suficiente para transformar todas las formas más activas en el complejo deseado (100). La estequiometría de la reacción (figura 32) indica que se necesitan 2 equivalentes de Zn por equivalente de  $\text{CH}_2\text{X}_2$ . Esa fue la proporción exactamente agregada. Sin embargo no debe olvidarse que durante la activación del Zn, se produce la deposición de Pb mediante una reacción redox que consume Zn. Por lo tanto el Zn en realidad se encontraría en menor proporción que la necesaria, lo cual hace que quede una cierta proporción de  $\text{I-CH}_2\text{-Zn-I}$ , responsable de la ciclopropanación.

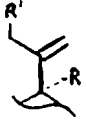
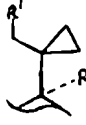
Por esta razón se decidió aumentar la relación  $\text{Zn/CH}_2\text{I}_2$ , disminuyendo la cantidad de  $\text{CH}_2\text{I}_2$  agregada (de 20 a 15 mmoles para 40 mmoles de Zn). De este modo, aunque se produjera la deposición del 50 % del Pb con el consiguiente consumo de Zn (10 mmoles), el remanente de este metal aún sería suficiente para la transformación total del complejo en la forma menos activa.

En dichas condiciones la reacción del complejo 100 con el 17 $\alpha$ -hidroxiesteroide 3 produjo el 20-metilenesteroide deseado 97 como componente mayoritario de una mezcla donde no se observó el gem-ciclopropilderivado 96.

Una vez puesta a punto la reacción, se repitió con similar resultado sobre 11-desoxicorticosterona (4) y cortexolona (2). La síntesis del 20-metilenderivado de este último esteroide (compuesto 99) fue la que se logró con mejor rendimiento (80 %) presumiblemente debido a la doble activación del carbonilo-20 por la presencia simultánea de los hidroxilos 17 $\alpha$  y 21 a los cuales se uniría el Zn complejo.

Los resultados se resumen en la tabla II-6.

Tabla II-6: Reacción de 17 $\alpha$  y/o 21-hidroxi progesteronas con complejos (Zn-CH<sub>2</sub>) obtenidos en distintas condiciones.

Est. (a)	Cupla	CH <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	Solvente	t (b)		
3	Zn(Cu)	CH <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	Eter	4 hs	--	50 %
3	Zn(Cu)	CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	Eter	4 hs	--	50 %
3	Zn(Pb)	CH <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	THF	1 h	20 %	40 %
3	Zn(Pb)	CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	THF	1 h	25 %	40 %
3	Zn(Pb)	CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	THF	4 hs	45 %	20 %
3	Zn(Pb)	CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub> (c)	THF	4 hs	60 %	--
4	Zn(Pb)	CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub> (c)	THF	4 hs	70 %	--
2	Zn(Pb)	CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub> (c)	THF	4 hs	80 %	--

(a) Esteroide de partida. Ver estructuras correspondientes en figura 1, pág. 4.

(b) Tiempo de preparación del complejo.

(c) Menor proporción de CH<sub>2</sub>I<sub>2</sub> que la descripta <sup>84</sup>.

II.6. Reacción de 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona y su 17 $\alpha$ -hidroxiderivado con Níquel Raney de distinta actividad.

GENERALIDADES:

Como se indicara en II.4. (pág. 81), dos de los sustratos sobre los que se ensayó la reacción de Wittig con vista a obtener 20-metilenesteroides, fueron 20-cetopregnano (24) y su derivado 17 $\alpha$  hidroxilado (89). Como también se mencionara entonces, dichos esteroides fueron preparados a partir de progesterona (1) y 17 $\alpha$ -hidroxiprogestero<sup>n</sup>a (3) respectivamente, mediante una secuencia de transformación específica del sistema  $\Delta^4$ -3-ceto en el benciltioenoléter correspondiente, su eliminación con W-2 níquel Raney y finalmente hidrogenación del producto resultante utilizando Pd/C como catalizador. Esta secuencia fue descripta por Rosenkranz y colaboradores <sup>80</sup> en 1951, para los dos esteroides en cuestión así como para 21-acetoxiprogestero<sup>n</sup>a (25).

Estos investigadores informaron que en la eliminación con W-2 níquel Raney de los benciltioenoléteres se obtenía como único producto los 3,5-dienos correspondientes (figura 33). En el caso del 21-acetoxiderivado observaron la hidrogenación parcial del dien<sup>o</sup>, no pudiendo mejorar la calidad del producto reduciendo el tiempo de reacción.

Rosenkranz y colaboradores habían informado dos años antes <sup>86</sup> la eliminación del benciltioenoléter de androsta-4-en-3,17-diona (compuesto 101, figura 34) utilizando W-2 níquel Raney previamente desactivado por calentamiento a reflujo en acetona (1 hora)



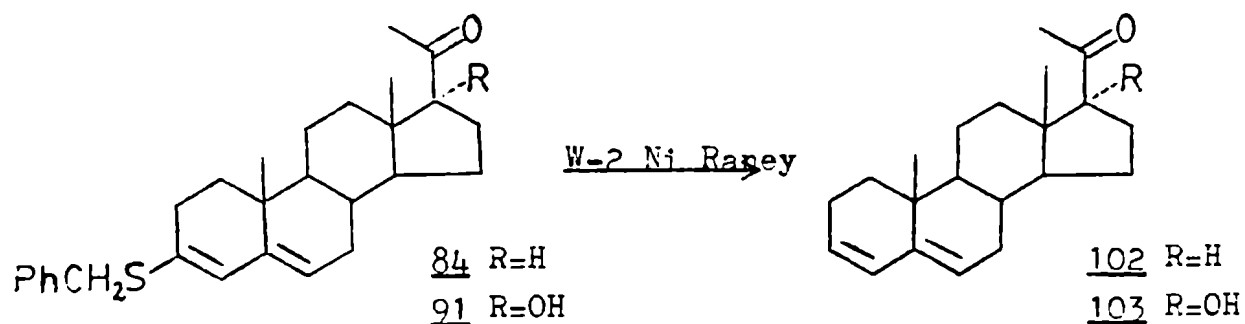


Figura 33: Síntesis de 3,5-dien-esteroides por eliminación de 3-benziltio-3,5-dienos (referencia 80).

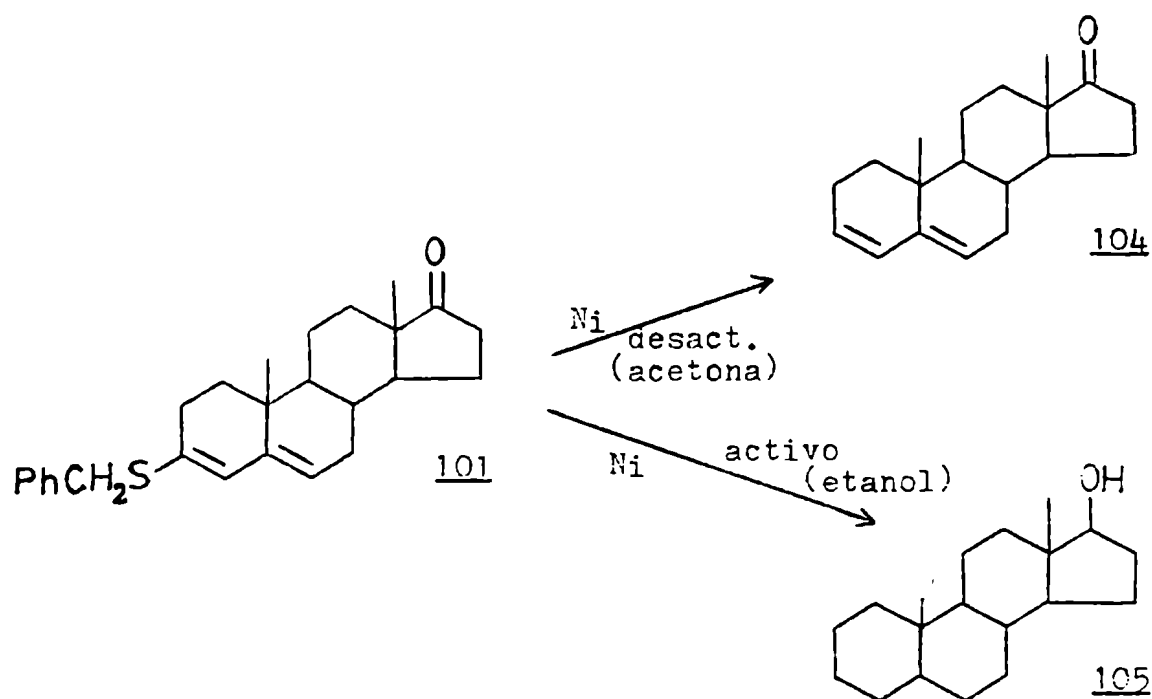


Figura 34: Reacción de 3-benziltio-androsta-3,5-dien-17-ona (101) con níquel Raney de distinta actividad (referencia 86).

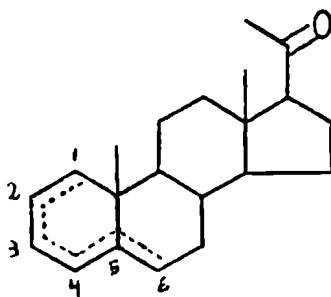
dando lugar al 3,5-dien-esteroide correspondiente (104). Utilizando el metal totalmente activo (en etanol o dioxano) se producía la eliminación del tioenoléter acompañada de la hidrogenación total del esteroide, obteniéndose como único producto androstan-17 $\beta$ -ol (105)(figura 34).

#### RESULTADOS Y DISCUSION:

La síntesis de los benciltioenoléteres de progesterona y 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (compuestos 84 y 91) se realizó por reacción de estos esteroides con bencilmercaptano en benceno anhidro/etanol absoluto, utilizando clorhidrato de piridina como catalizador <sup>80</sup>. Este catalizador permite la formación de benciltioenoléteres sobre C3 en sistemas  $\Delta^4$ -3-ceto, sin afectar el carbonilo-20 ni la formación de mercaptos, como sucede cuando se utilizan otros catalizadores como el  $ZnCl_2$  <sup>87</sup>.

En la eliminación de los tioéteres 84 y 91 con W-2 níquel Raney, recientemente preparado <sup>88</sup>, en acetona a reflujo, no se obtuvieron los dienos 102 y 103 indicados en la referencia 80. El producto de reacción consistió en una mezcla de 20-ceto pregnanos en la cual se identificaron los esteroides indicados en la figura 35 (17 $\alpha$ -hidroxianálogos en el caso de 91), el más importante de los cuales resultó ser el  $\Delta^2$ -derivado (110).

De todos modos, para la preparación de 20-cetopregnanos (24 y 80) no importaba si el producto de eliminación se trataba del dieno previamente descrito o de una mezcla de 20-cetoesteroides,



	Insaturaciones	H5
<u>24</u> 5 $\alpha$ -pregnan-20-ona	-	5 $\alpha$
<u>102</u> pregna-3,5-dien-20-ona	3,4/5,6	-
<u>106</u> pregna-2,4-dien-20-ona	2,3/4,5	-
<u>107</u> pregn-5-en-20-ona	5,6	-
<u>108</u> pregn-4-en-20-ona	4,5	-
<u>109</u> pregn-3-en-20-ona	3,4	5 $\alpha$
<u>110</u> pregn-2-en-20-ona	2,3	5 $\alpha$
<u>111</u> pregn-1-en-20-ona	1,2	5 $\alpha$

Figura 35: Componentes de la mezcla de reacción de 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) con W-2 níquel Raney.

ya que por hidrogenación de cualquiera de ellos se obtendría el compuesto necesario.

Sin embargo la obtención de pregn-2-en-20-ona (110) como producto principal de eliminación implicaba además de la hidrogenación parcial del esteroide, la migración de la insaturación hacia dicha posición. Por lo tanto se decidió estudiar en más detalle

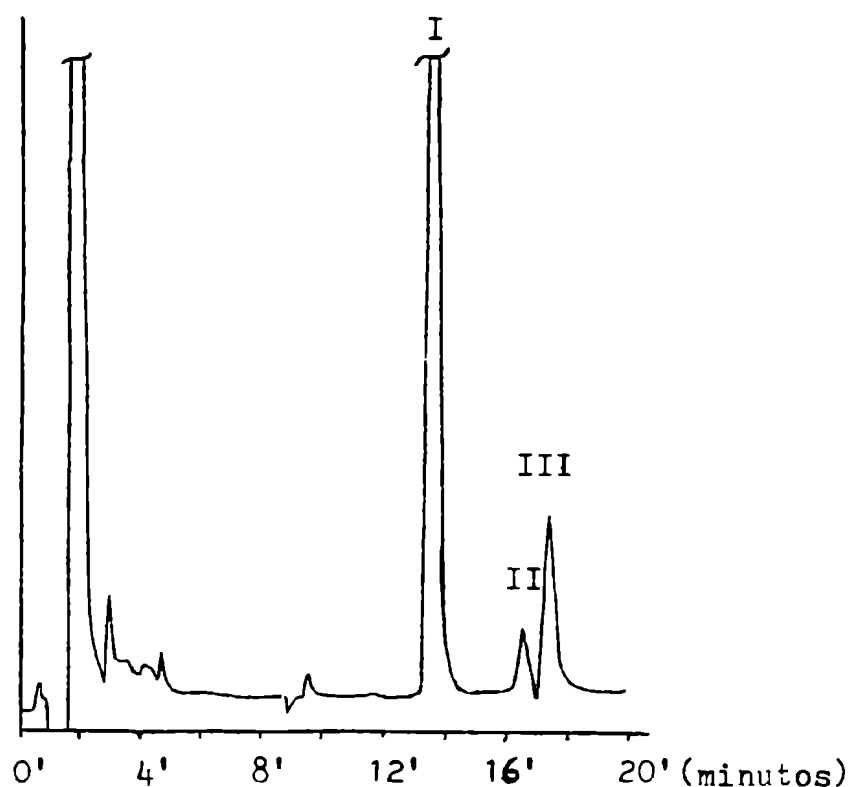
el mecanismo por el cual se produjo este esteroide en la reacción.

Para ello fue menester identificar totalmente los componentes de la mezcla de eliminación, ya mencionados anteriormente, así como la realización de reacciones similares que brindaran información acerca del proceso observado, y la síntesis de esteroides, necesarios para confirmar la identificación de las estructuras aisladas.

La eliminación del benciltioenoléter de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona utilizando W-2 níquel Raney produjo una mezcla similar a la obtenida en el caso de la eliminación del derivado de progeste<sub>r</sub>ona (los  $17\alpha$ -hidroxiesteroides obtenidos solo fueron analizados por RMN- $^{13}\text{C}$  en la mezcla sin separar). Los estudios posteriores se realizaron utilizando solo los derivados de progesterona como sustrato.

#### II.6.1. Reacción con níquel Raney desactivado:

La reacción de eliminación del benciltioenoléter de progesterona (compuesto 84) utilizando níquel Raney desactivado por calentamiento a reflujo en acetona durante una hora <sup>86</sup>, previo al agregado del esteroide, dio un producto homogéneo por cromatografía en capa delgada convencional (silicagel) y en silicagel impregnada con  $\text{AgNO}_3$ . Sin embargo cuando se sometió el producto a la cromatografía líquida de alta resolución (clar), utilizando una columna Ultrasphere ODS y metanol/agua (95:5) como solvente se observó que se trataba de una mezcla de tres componentes en una relación 87:3:10 (figura 36).



**Figura 36:** Cromatografía líquida de alta resolución del producto de reacción entre 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona y níquel Raney desactivado.

Los esteroides separados por clar utilizando el mismo sistema cromatográfico, fueron analizados por e.m., RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ .

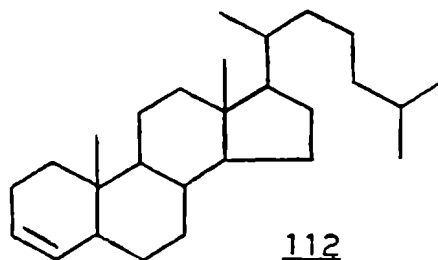
El componente principal (pico I de la figura 36) fue comparado espectroscópicamente con el pregna-3,5-dien-20-ona (102) sintetizado por deshidratación de pregnenolona (75)<sup>80</sup> como se indica en la página 116, coincidiendo totalmente con el mismo. Las principales señales de los espectros de masa, RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  de estos productos, así como de los otros aislados de las mezclas de reacción con níquel Raney en las distintas condiciones ensayadas, se encuentran resumidas en las tablas III-1 (pág. 142), III-8 (pág.

180) y III-11 (pág. 202) respectivamente, del capítulo III donde se presenta un detallado análisis comparativo de las mismas.

El espectro de masa del pico II, componente de menor proporción, presentaba un ión molecular a  $m/z$  300 característico de 20-cetopregnanos monoinsaturados. El espectro RMN- $^1H$  presentaba las señales características de los metilos no acoplados (metilos-18, 19 y 21). Las dos primeras coincidieron con los valores calculados para pregn-4-en-20-ona (108) a partir de las tablas de efecto de sustituyentes desarrollada por Zürcher <sup>89</sup>, que se discutirá en el capítulo III (pág. 179). También se observó una banda ancha a  $\delta$  5,30 ppm que integraba para un solo hidrógeno, correspondiente al H<sub>4</sub> (ensanchada por acoplamiento con los hidrógenos de C3 y C6).

El espectro de masa del tercer componente de la mezcla (pico III) presentó un ión molecular a  $m/z$  300 indicativo de 20-cetopregnanos monoinsaturados. El espectro RMN- $^1H$  mostró dos dobletes en la región de dobles enlaces ( $\delta$  5,28 y 5,56 ppm,  $J=10Hz$ ), típico de un compuesto insaturado cuyos hidrógenos olefínicos se encuentran en configuración cis y en entornos químicos diferentes. El espectro coincide además con las señales del producto secundario de la síntesis de pregn-2-en-20-ona (110) como se detalla en la página 116, para la cual está descripta <sup>90</sup> la formación de una pequeña cantidad del  $\Delta^3$ -derivado (en el caso del colesterilanálogo).

Su espectro de RMN- $^{13}C$  confirmó la estructura propuesta ya que presentó una adecuada correlación con el espectro de  $\Delta^3$ -colestano (112), en la región esteroideal equivalente, descripto por Eggert y Djerassi <sup>91</sup>. Por lo tanto el tercer componente sería el  $\Delta^3$ -20-cetopregnano (109).



La mezcla de reacción con níquel Raney desactivado estaría compuesta, entonces, por pregna-3,5-dien-20-ona (102), pregn-4-en-20-ona (108) y pregn-3-en-20-ona (109) en ese orden de elución en clar.

Posiblemente el producto obtenido por Rosenkranz y colaboradores<sup>80</sup> utilizando W-2 níquel Raney sin desactivar fuese similar al obtenido en las condiciones discutidas (níquel Raney desactivado) en el presente trabajo ya que en ese entonces hubiese sido difícil descubrir la presencia de los esteroides monoinsaturados que acompañan al dieno. Esto indicaría además que el W-2 níquel Raney utilizado entonces se hallaba notablemente desactivado.

La variabilidad en los resultados de eliminación de tioéteres con níquel Raney es frecuente ya que la actividad de este metal depende en gran medida de su origen y antigüedad<sup>92,93</sup>.

### II.6.2. Reacción con W-2 níquel Raney:

Cuando la eliminación del benciltioenoléter 84 fue realizada con W-2 níquel Raney sin desactivar se obtuvo una mezcla aún más compleja.

El análisis por cromatografía en capa delgada indicó nuevamente que se trataba aparentemente de un producto homogéneo. Sin embargo cuando se desarrolló en placas de silicagel impregnadas con  $\text{AgNO}_3$  se evidenció su heterogeneidad, notándose la presencia de por lo menos cuatro componentes. El análisis por clar en una columna RS-11 C18 HL utilizando metanol como solvente, confirmó que el producto de reacción se trataba de una mezcla (figura 37).

En un intento de elucidar completamente la composición de la mezcla, se fraccionó la misma por clar preparativa en tres fracciones correspondientes al pico I junto con el pequeño pico anterior, el pico II y el III (figura 37).

El espectro RMN- $^1\text{H}$  de la fracción de mayor tiempo de retención (pico III, 15 % de la mezcla), no presentaba ninguna señal en la región de los hidrógenos olefínicos. Las únicas señales destacables en el mismo eran los tres singuletes correspondientes a los metilos 18, 19 y 21. Los mismos coincidieron con lo descrito en literatura <sup>94</sup> para  $5\alpha$ -pregnan-20-ona (24) y con el espectro del componente principal de la mezcla obtenida por hidrogenación del producto de eliminación (ver más adelante). La fracción fue analizada también por e.m. obteniéndose un ión molecular indicativo del esteroide saturado ( $m/z$  302). Comparando este espectro con el obtenido a partir del producto de hidrogenación y con datos de litera-



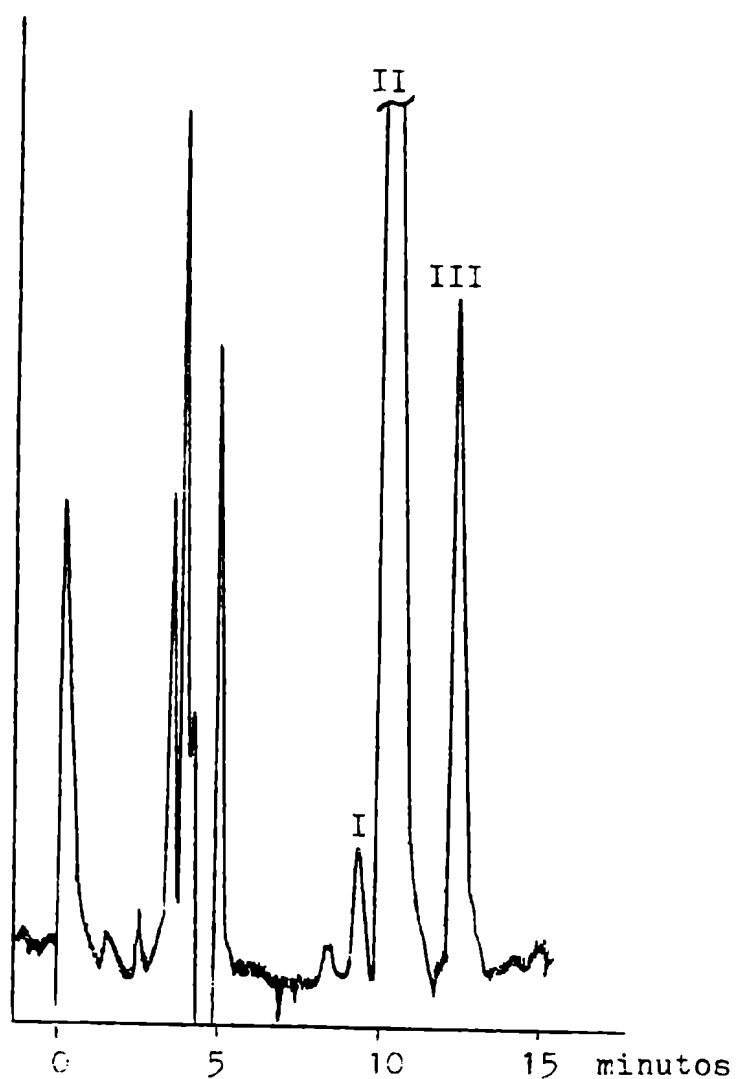
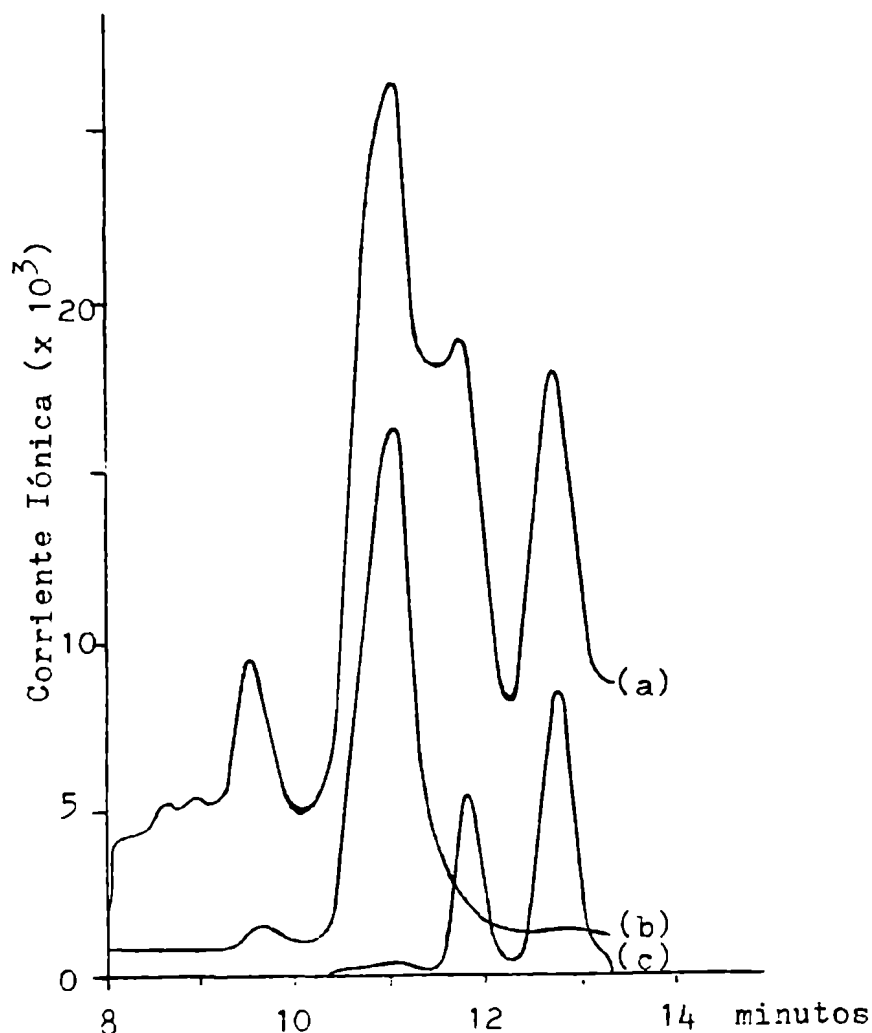


Figura 37: Cromatografía líquida de alta resolución del producto de reacción entre 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona y W-2 níquel Raney sin desactivar.

tura <sup>95</sup>, se confirmó totalmente la estructura propuesta.

El pico I (junto con el pequeño pico anterior)(5 % de la mezcla) fue analizado por cromatografía gas-líquido acoplada al en

pectrómetro de masa (cgl-em), resultando estar formado por tres esteroides (figura 38). El análisis del cromatograma correspondiente mediante la técnica de barrido específico de picos, indicó que el mayor componente de este sistema era un esteroide monoinsatura



- (a) Corriente iónica total.
- (b) Barrido del pico  $m/z$  300.
- (c) Barrido del pico  $m/z$  298.

Figura 38: Cromatografía gas-líquido/espectrometría de masa del pico I (junto con el pequeño pico anterior) de la figura 37.

do (ión molecular  $m/z$  300) mientras que los otros dos correspondieron a compuestos diinsaturados (ión molecular  $m/z$  298), posiblemente pregna-2,4-dien-20-ona (106) y pregna-3,5-dien-20-ona (102), determinados por comparación con los espectros de masa de muestras auténticas, sintetizadas por otros métodos, como se menciona en la página 116. Cada uno de los dienos correspondieron al 1 % de la mezcla total. El espectro de RMN- $^1H$  de la mezcla mostraba una gran complejidad en la región de hidrógenos olefínicos, en la cual podían detectarse las señales correspondientes a H3, H4 y H6 del 3,5-dien-esteroide (102) y a H2, H3 y H4 del 2,4-dienderivado, además de otras señales que corresponderían al esteroide monoinsaturado. La región correspondiente a los metilos presentaba dos señales debido al metilo-21 ( $\delta$  2,14-2,12 ppm), otras tres ( $\delta$  0,62-0,65-0,66 ppm) correspondientes al metilo-18 de las tres especies y una ( $\delta$  0,96 ppm) correspondiente a los metilos-19. Las señales confirman la naturaleza de los dienos como los 2,4 y 3,5-dienderivados (nuevamente por comparación con muestras auténticas).

La distribución de las señales sobrantes de la región de dobles enlaces correspondería a dos dobletes anchos, similares a los del  $\Delta^3$ -esteroide 109 aunque levemente desplazados hacia campos más bajos (aproximadamente 0,1 ppm). La posibilidad de que el esteroide monoinsaturado de la fracción I se trate del  $\Delta^3$ -derivado puede ser descartada totalmente ya que este último presentaba en su espectro de RMN- $^1H$  una señal a  $\delta$  0,78 ppm correspondiente al metilo-19, mientras que en el espectro de la fracción I no se observaban señales en esa región. La posición de la señal del metilo-19 es característica de esteroides cuyo metilo se encuentra sobre un

carbono alílico.

Por lo tanto el componente principal de la fracción I sería pregn-1-en-20-ona (111)(3 % del total de la mezcla). Este esteroide presenta un doble enlace con dos hidrógenos en configuración cis, cuyos entornos químicos son distintos. Además el metilo-19 se encuentra sobre un carbono alílico, de acuerdo con las características deducidas del espectro.

Esta fracción no pudo ser analizada por RMN- $^{13}\text{C}$  debido a la poca masa de la misma de que se disponía (2 mg de la mezcla).

Por último, el pico II (80 % de la mezcla) pudo ser fraccionado en dos porciones por HPLC utilizando una columna Ultrasphere ODS y metanol/agua (95:5) como eluyente (figura 39).

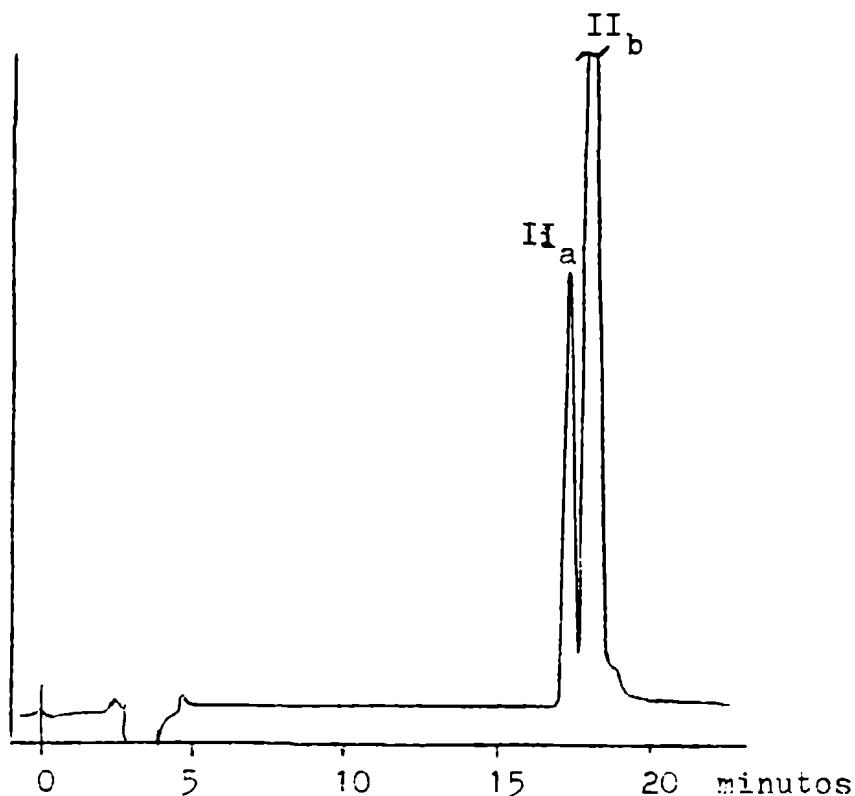


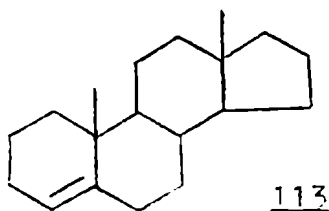
Figura 39: Fraccionamiento por cromatografía líquida de alta resolución del pico II de la figura 37.

La fracción minoritaria ( $II_a$ ) (13 % del total de la mezcla) resultó ser pregn-4-en-20-ona (108), coincidente (e.m. y RMN- $^1H$ ) con el producto minoritario aislado de la mezcla de eliminación del benciltioéter de progesterona con níquel Raney desactivado (pág.102).

La naturaleza de este compuesto fue confirmada por el análisis de su espectro de RMN- $^{13}C$  ya que éste coincidió con el espectro de androst-4-eno (113) (en la región equivalente del esteroide) descrito en literatura <sup>91</sup>.

La fracción restante ( $II_b$ ), la cual no pudo separarse en sus componentes por ningún otro método, fue analizada por e.m., RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$ . El e.m. del pico indicaba la presencia de compuestos monoinsaturados. El espectro de la fracción se encontraba dominado por una ruptura de tipo retro Diels Alders del anillo A, característica de los  $\Delta^2$ -esteroides.

El espectro RMN- $^{13}C$  de la mezcla confirmó la naturaleza de dicho componente (54 % de la mezcla total), indicando además que se encontraba acompañado de sus isómeros pregn-3-en-20-ona (109) y pregn-5-en-20-ona (107) (3 y 10 % de la mezcla total respectivamente). Los espectros coincidieron con los de los androstanos y colestanos correspondientes (en las regiones equivalentes de los esteroides) descritos por Eggert y Djerassi <sup>91</sup>.



El espectro del  $\Delta^3$ -derivado coincidió con el correspondiente al esteroide de mayor tiempo de retención aislado de la mezcla de eliminación del tioéter con níquel Raney desactivado.

La tabla II-7 resume la composición de las mezclas obtenidas en la reacción de 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) con níquel Raney, así como los productos de hidrogenación en distintas condiciones del producto obtenido utilizando W-2 níquel Raney sin desactivar, como se discute más adelante (II.6.3).

Tabla II-7: Composición de los productos de reacción de 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) con níquel Raney de distinta actividad, y de los productos de hidrogenación de la mezcla obtenida en la reacción con W-2 níquel Raney.

Condiciones		Productos <sup>(a)</sup>								
Níquel	H <sub>2</sub> <sup>(b)</sup>	<u>102</u>	<u>106</u>	<u>107</u>	<u>108</u>	<u>109</u>	<u>110</u>	<u>111</u>	<u>24</u>	<u>114</u>
W-2 <sup>(c)</sup>	--	1%	1%	10%	13%	3%	54%	3%	15%	-
desact. <sup>(d)</sup>	--	87%	-	-	3%	10%	-	-	-	-
W-2 <sup>(c)</sup>	1 h	-	-	8%	8%	-	-	-	80%	4%
W-2 <sup>(c)</sup>	8 hs	-	-	-	-	-	-	-	89%	11%

(a) Porcentajes calculados por clar y cgl-em. Ver estructuras en figura 35 (pág. 99) y en la página 112.

(b) Pd/C, 1 Atm. de presión, temperatura ambiente.

(c) 4 hs a reflujo en acetona.

(d) Desactivado por calentamiento a reflujo en acetona (1 h), previo al agregado del esteroide (luego 4 hs a reflujo).

### II.6.3. Hidrogenación del producto de reacción con W-2 níquel Raney:

Con la intención de aislar de la mezcla de reacción el  $\Delta^5$ -esteroide 107 y confirmar inequívocamente su existencia en la misma, se hidrogenó parcialmente el producto de eliminación (con W-2 níquel Raney sin desactivar), utilizando Pd/C como catalizador.

La facilidad con que un doble enlace se hidrogena depende en gran medida de su ubicación en el esqueleto esteroideal 96a.  $\Delta^1$ ,  $\Delta^2$  y  $\Delta^3$ -esteroides son más fácilmente hidrogenados que los  $\Delta^4$  y  $\Delta^5$  derivados. Controlando las condiciones de hidrogenación sería posible entonces, hidrogenar los tres primeros sin afectar en gran medida los dos últimos.

Realizada la hidrogenación a temperatura ambiente y presión atmosférica de la mezcla de reacción durante 8 hs se obtuvo como único producto una mezcla de  $5\alpha$  y  $5\beta$ -pregnan-20-onas (24 y 114 respectivamente) en relación 89:11 (tabla II-7). La configuración de C5 pudo asignarse fácilmente por RMN- $^1\text{H}$  (la señal del metilo-19 difiere notablemente) coincidiendo con los espectros descritos en literatura <sup>94</sup>. Dicha asignación se confirmó por RMN- $^{13}\text{C}$ .

El  $5\beta$ -esteroide 114 provendría de la hidrogenación del  $\Delta^4$ -derivado (108), el cual se encuentra en una conformación semi-silla (figura 40) que permite el ataque del  $\text{H}_2$  por la cara  $\beta$  del esteroide (de acuerdo a resultados de literatura indicados para la hidrogenación de  $\Delta^4$ -esteroides <sup>97</sup>). En cambio en los  $\Delta^5$ -derivados la hidrogenación se produce por la cara  $\alpha$ , dando origen a los  $5\alpha$ -derivados. La relación  $5\beta/5\alpha$  observada (ver tabla II-7) fue similar a la proporción  $\Delta^4$ -esteroide/resto, lo cual confirmaría el ori

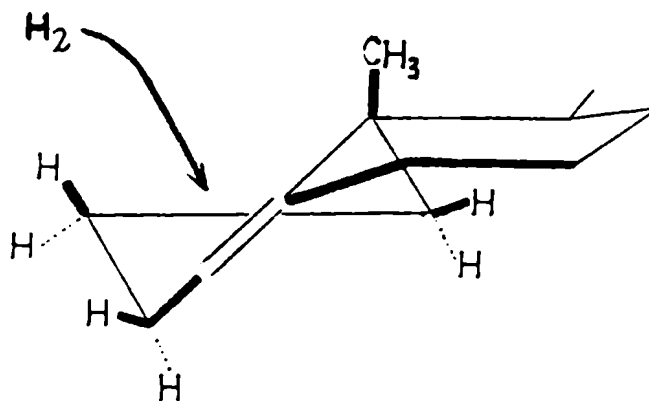
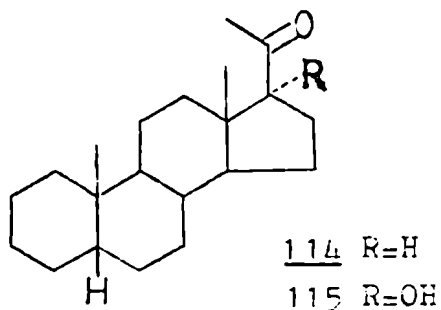


Figura 40: Conformación de los anillos A y B en  $\Delta^4$ -esteroides (referencia 97).

gen propuesto para 114.

La hidrogenación en condiciones similares (12 hs) del producto de eliminación del tioéter en el caso del  $17\alpha$ -hidroxiesteroide (compuesto 91) dio como resultado una mezcla de  $17\alpha$ -hidroxio- $5\alpha$ -pregnan-20-ona (39) y su  $5\beta$ -análogo (115) en proporción similar a la obtenida en el caso anterior.





Cuando se redujo el tiempo de hidrogenación del producto de eliminación a solo una hora, se aisló una mezcla de cuatro esteroides cuya cromatografía líquida de alta resolución se muestra en la figura 41. Gracias a la notable resolución de la mezcla en clar fue posible separar los componentes, identificándolos en forma individual (e.m., RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ ). Los esteroides resultaron ser pregn-4-en-20-ona (108), pregn-5-en-20-ona (107),  $5\beta$ -pregnan-20-ona (114) y  $5\alpha$ -pregnan-20-ona (24) en el orden de elución en clar (8:8:4:80)(tabla II-7, pág.110).

Como puede observarse, la relación  $\Delta^4 + 5\beta$ -esteroides/ $\Delta^5 + 5\alpha$ -esteroides nuevamente resultó comparable a las relaciones  $\Delta^4$ -esteroide/resto en la mezcla original y  $5\beta/5\alpha$ -20-cetopregnanos en el producto de hidrogenación total, avalando el origen propuesto para  $5\beta$ -pregnan-20-ona (114).

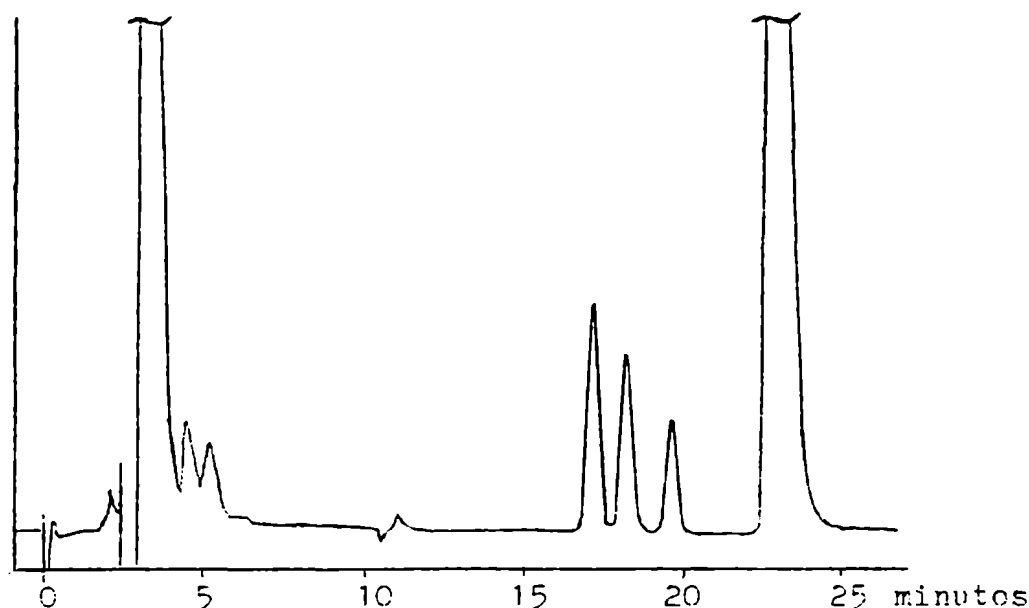


Figura 41: clar del producto de hidrogenación parcial de la mezcla de reacción entre W-2 níquel Raney y 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84).

El aislamiento del  $\Delta^5$ -esteroide permitió obtener un espectro de masas del mismo en forma pura ya que hasta el momento había resultado imposible debido a que no se pudo separar del  $\Delta^2$ -derivado por ninguno de los métodos ensayados.

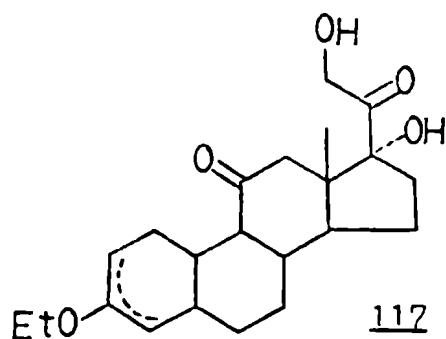
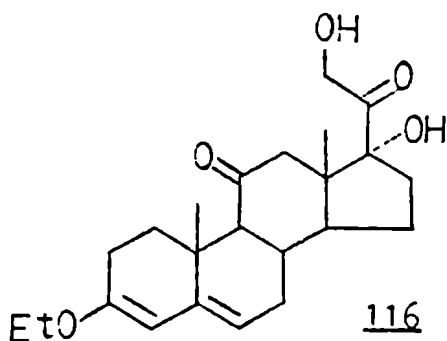
Es así que gracias a la utilización de distintos métodos espectroscópicos que se complementaron entre sí y con la ayuda de métodos separativos de alta resolución (clar, cgl) fue posible de terminar completamente la naturaleza de los productos "anómalos" formados en la reacción de 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona con W-2 níquel Raney.

#### II.6.4. Reacciones complementarias:

Se decidió verificar si los procesos de reducción y reordenamiento sufridos por el esteroide además de la desulfuración, requerían la presencia del tioéter o eran posteriores a su eliminación. Rosenkranz y colaboradores<sup>86</sup> propusieron que el primer paso de la transformación de 3-benciltio-androsta-3,5-dien-17-ona (101) en androstan-17-ol (105) (figura 34, pág. 97) con W-2 níquel Raney activo, consistía en la hidrogenólisis del átomo de azufre.

Sin embargo, la hidrogenación parcial del 3-etilenoléter de cortisona (116) utilizando Pd/C como catalizador produjo 3-etoxi-17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-pregn-2-en-11,20-diona y/o el  $\Delta^3$ -análogo (117) por reducción selectiva de la unión 5,6 de acuerdo a lo indicado por Augustine<sup>96b</sup>.

Cuando se ensayó la reacción de pregna-3,5-dien-20-ona (102) (preparado por deshidratación de pregnenolona (75) como se in



dica más adelante (pág. 116)) con W-2 níquel Raney sin desactivar, se obtuvo una mezcla de productos igual a la obtenida en la eliminación del tioenoléter (tabla II-7, pág. 110).

Este resultado apoyaría la propuesta que indica que el primer paso de la reacción consiste en la hidrogenólisis del azufre <sup>86</sup>.

Se ensayó también la disminución del tiempo de reacción con el fin de verificar si se producían diferencias en las proporciones de los productos que pudieran dar información acerca de una posible formación secuencial entre los mismos. Se ensayó la eliminación del benciltioenoléter con W-2 níquel Raney sin desactivar disminuyendo el tiempo de calentamiento a reflujo en acetona a 1, 2 y 3 hs (en lugar de las 4 hs habituales). También se ensayó la eliminación a temperatura ambiente (2-4 hs), obteniéndose en todos los casos la misma mezcla que se produjo luego de 4 hs de calentamiento a reflujo (tabla II-7, pág. 110). Por lo tanto la reacción con W-2 níquel Raney requeriría de condiciones mucho menos drásti

cas (menos de 2 hs a temperatura ambiente) que las indicadas <sup>80</sup> (4 hs de calentamiento a reflujo).

Para la elucidación estructural de los componentes de la mezcla se sintetizaron los siguientes esteroides: pregna-3,5-dien-20-ona (102), pregna-2,4-dien-20-ona (106) y pregn-2-en-20-ona (110):

- Pregna-3,5-dien-20-ona: la deshidratación de pregnenolona (75) con  $P_2O_5$  en benceno anhidro a temperatura de reflujo <sup>80</sup> produjo con un 30 % de rendimiento el esteroide deseado. Este compuesto fue utilizado, además de ser comparado con los dienos constituyentes de las mezclas de eliminación, para la reacción con W-2 níquel Raney discutida anteriormente (pág. 114).

- Pregna-2,4-dien-20-ona: la deshidratación de pregnenolona (75) por calentamiento a 200-220°C en alúmina a presión reducida <sup>98</sup> produjo con bajo rendimiento (15 %) una mezcla del dieno esperado 106 y pregna-3,5-dien-20-ona (102) en relación 3:1, la cual fue separada por clar (columna Ultrasphere ODS, solvente metanol:agua 95:5), caracterizándose los dienos individualmente (e.m., RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C). La síntesis del 2,4-dien-esteroide resultó de suma utilidad en el aspecto espectroscópico debido a que no se disponía de referencias al respecto de esteroides con igual sustitución en el anillo A (e.m., RMN-<sup>1</sup>H ni RMN-<sup>13</sup>C).

- Pregn-2-en-20-ona: este esteroide fue preparado también a partir de pregnenolona (75) como una mezcla con el  $\Delta^3$ -esteroide.

El primer paso de la síntesis consistió en la hidrogenación cuantitativa y estereoespecífica de 75 a su 5 $\alpha$ -dihidroderivado 118 <sup>99</sup>. El producto así obtenido fue transformado en el tosila to correspondiente (119), el cual fue eliminado por calentamiento a reflujo en colidina (figura 42). Esta síntesis siguió la misma secuencia ya descripta <sup>90</sup> para los análogos ( $\Delta^2$  y  $\Delta^3$ ) con esquele to de colestano.

Los productos (109 y 110) no pudieron ser separados (clar, cgl). De todos modos la mezcla como tal fue útil para la comparación con los esteroides aislados en la reacción del tioenol éter de progesterona (compuesto 84) con níquel Raney activo, ya que la espectrometría de RMN-<sup>13</sup>C de la misma permitió la observación de todas las señales de ambos esteroides, fácilmente diferenciables por su muy distinta intensidad.

#### II.6.5. Mecanismos de eliminación propuestos:

En base a los resultados obtenidos es posible proponer un mecanismo que justifique la aparición de los productos observados en las distintas condiciones de reacción.

El primer paso del mecanismo sería la eliminación del tioéter por hidrogenólisis, tanto en el caso del níquel Raney previamente desactivado, como en el caso del reactivo sin desactivar, de acuerdo a los resultados obtenidos en la reacción de pregna-3,5-dien-20-ona (102) con W-2 níquel Raney sin desactivar.

Por lo tanto el primer intermediario de la reacción sería el dieno 102.

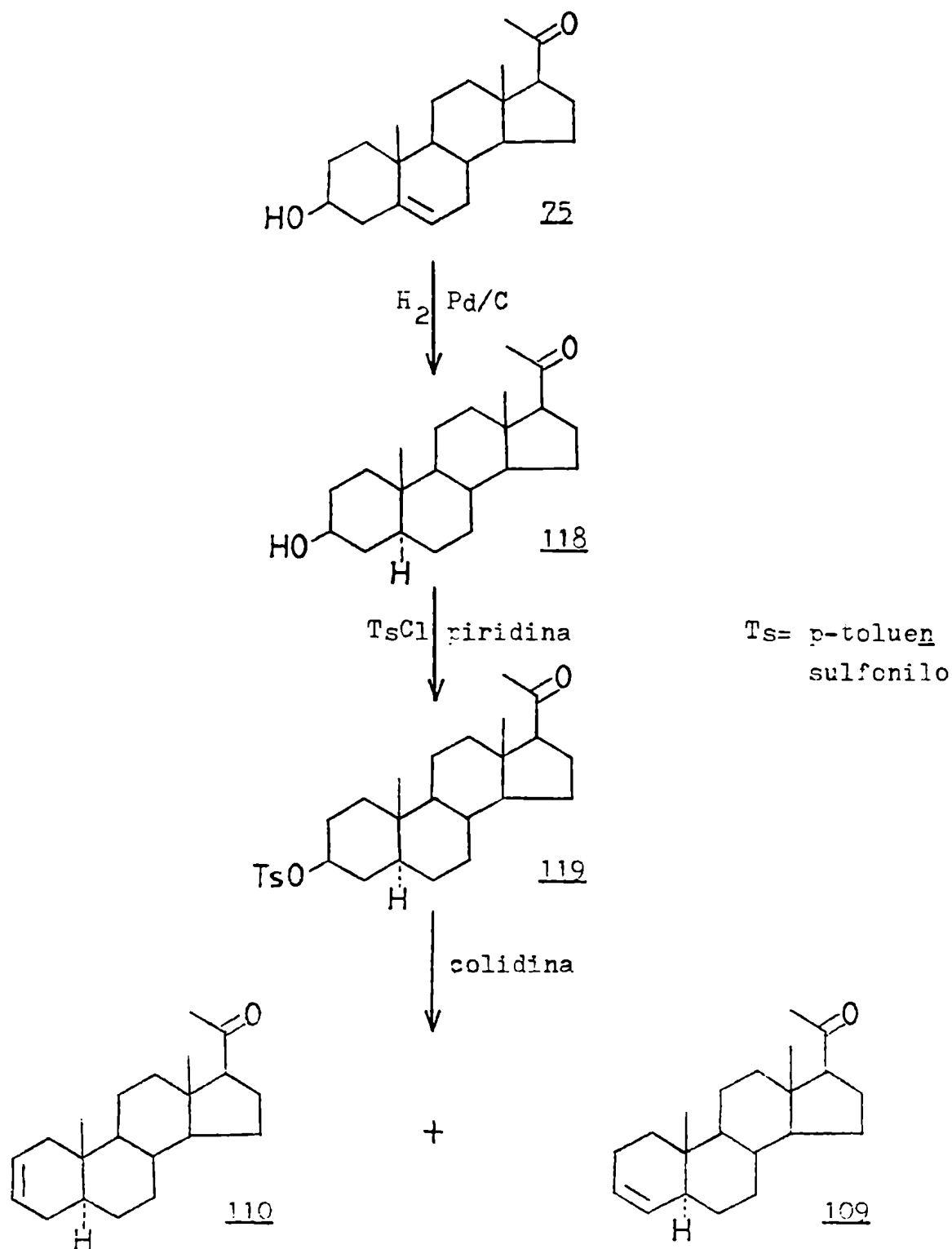


Figura 42: Síntesis de pregn-2-en-20-ona (110) y pregn-3-en-20-ona (109) a partir de pregnenolona (25).

El níquel Raney desactivado produciría entonces la hidrogenación específica de la posición 6 del dieno, dando lugar a un complejo del tipo  $\pi$ -enil-níquel (involucrando los carbonos 3, 4 y 5) (compuesto 120, figuras 43 y 44), el cual finalmente recibiría otro hidrógeno del metal en posiciones 3 (adición 1,4) dando el  $\Delta^4$ -esteroide (108), ó 5 (adición 1,2) dando lugar al  $\Delta^3$ -derivado (109) (figura 43).

No se observó la hidrogenación inicial sobre C3, dando el complejo  $\pi$ -enil-níquel sobre los carbonos 4, 5 y 6 (compuesto 121, figura 43 y 44), el cual, por transferencia de otro hidrógeno del metal daría lugar a los  $\Delta^4$  (108) y  $\Delta^5$  (107) esteroides (figura 43). Se descartó la formación del complejo anterior pues en el producto de reacción no se observó la presencia de 107.

El calentamiento bajo reflujo en acetona del níquel Raney produciría la disminución de la capacidad de hidrogenación del mismo, aislándose el dieno como producto principal. Además esa menor capacidad de hidrogenación haría que la reacción fuera más selectiva, produciendo el primer ataque de hidrógeno exclusivamente sobre C6. Esto probablemente se deba a la mayor estabilidad del complejo intermedio propuesto.

En cuanto al complejo intermedio, se encuentra descripta en literatura <sup>100</sup> la formación de complejos  $\pi$ -enil-paladio a partir de dienos, siendo los correspondientes complejos de níquel ampliamente conocidos.

Los complejos de níquel propuestos como intermediarios serían de muy poca estabilidad, sobre todo en presencia de hidrógeno activo que pudiese atacarlo, como en el presente caso. Por lo

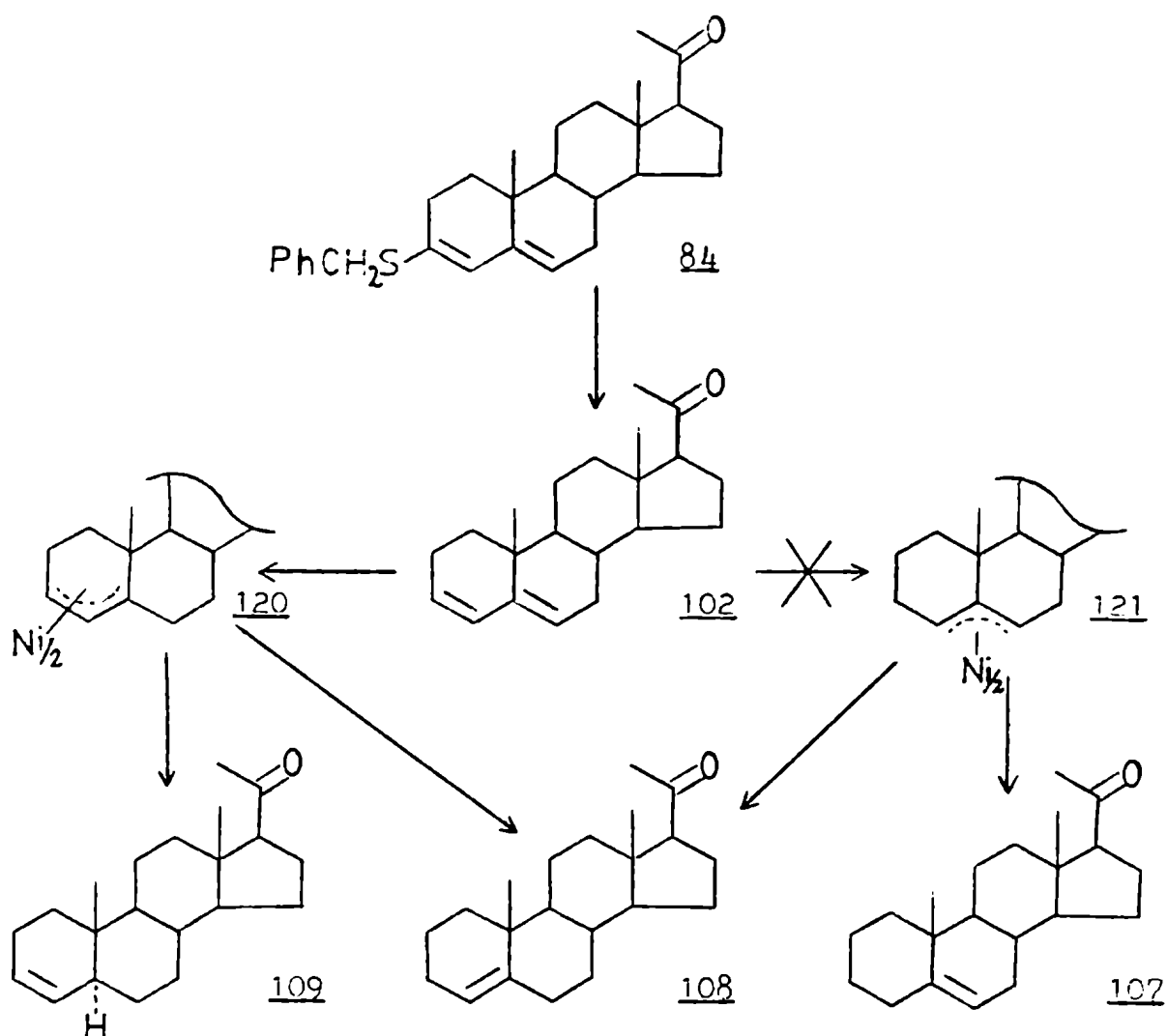


Figura 43: Mecanismo propuesto para la formación de los productos obtenidos en la reacción entre 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona y níquel Raney desactivado.

tanto es probable que los mismos no tengan existencia real y que el proceso sea simplemente un fenómeno de superficie sobre el metal (aunque sería imposible determinar si en la superficie del metal existe una interacción níquel-esteroide del tipo del complejo propuesto). Sin embargo el planteo de estos complejos inestables, no caracterizados, sirve como herramienta de suma utilidad para la



explicación de los resultados obtenidos (es el concepto de "intermediarios transitorios" presentado por Semmelhack <sup>101</sup>).

La reacción de W-2 níquel Raney sin desactivar con pregn-3,5-dien-20-ona (102) (sobre el esteroide agregado como tal o sobre el producto de hidrogenólisis previa del tioéter) produjo la mezcla compleja detallada anteriormente (tabla II-7, pág. 110).

El mayor grado de reducción del producto obtenido indica una mayor capacidad de hidrogenación del reactivo. Esa mayor reactividad del mismo haría que este perdiera su especificidad, produciendo la hidrogenación inicial tanto sobre C6 (al igual que el metal desactivado) como sobre C3. Esto justificaría la presencia en la mezcla de pregn-3-en-20-ona (109), pregn-4-en-20-ona (108) y pregn-5-en-20-ona (107), así como del dieno 102 a partir del cual se originarían y del compuesto saturado (por una posterior hidrogenación de alguno o todos los esteroides monoinsaturados). Sin embargo esta mayor capacidad de hidrogenación no es suficiente para justificar la formación de pregn-1-en-20-ona (111), pregn-2-en-20-ona (110) y pregn-2,4-dien-20-ona (106).

La formación del 2-en-derivado 110 se produciría a través de una reacción de isomerización <sup>102</sup> a partir del  $\Delta^3$ -esteroide (109) por labilización de un hidrógeno de posición 2, sustracción de dicho hidrógeno con la consiguiente formación de un complejo  $\pi$ -enil-níquel involucrando los carbonos 2, 3 y 4 (compuesto 122, figura 44), el cual sería atacado por un hidrógeno sobre el C4 del complejo dando pregn-2-en-20-ona (110) (figura 44).

Del mismo modo se formaría el  $\Delta^1$ -derivado (111) a partir

del  $\Delta^2$ -isómero (110) a través del complejo  $\pi$ -enil-níquel sobre los carbonos 1, 2 y 3 (compuesto 123, figura 44).

La formación propuesta para estos compuestos implica la necesidad de que el reactivo metálico además de la función de hidrogenación, sea capaz de la labilización y sustracción de hidrógenos en posición  $\alpha$  a dobles enlaces. Dicha capacidad de eliminación de átomos de hidrógeno del esteroide haría que los procesos de hidrogenación que llevan de los distintos complejos  $\pi$ -enil-níquel a los esteroides monoinsaturados fueran reversibles, estableciéndose el equilibrio entre todas las especies monoinsaturadas presentes. Este hecho justificaría la proporción de los distintos esteroides.

Por ejemplo, el  $\Delta^2$ -derivado (110) (producto mayoritario de la mezcla) es más estable que sus análogos insaturados en posiciones 1,2 (111) ó 3,4 (109).<sup>103</sup>. Esto se debe a que cuando se introduce un doble enlace en un ciclohexano se produce la distorsión de la conformación de los carbonos  $\alpha$ , localizándose los sustituyentes unidos a los mismos en posiciones cuasiecuatorial y cuasiaxiales. En el caso de 110 dichos sustituyentes corresponden a hidrógenos, no afectándose mayormente el resto de la molécula. En cambio en el caso de 109, y en forma similar en el caso de 111, la unión 5,6 debe tomar una conformación cuasiecuatorial, distorsionando la forma silla del anillo E, lo cual produce tensiones que disminuyen la estabilidad del isómero. Esto también justificaría la no existencia (al menos en cantidad detectable) de pregn-6-en-20-ona (124) que podría obtenerse por isomerización de su  $\Delta^5$ -análogo (107). Dicho esteroide sería notablemente menos estable ya que un doble en-

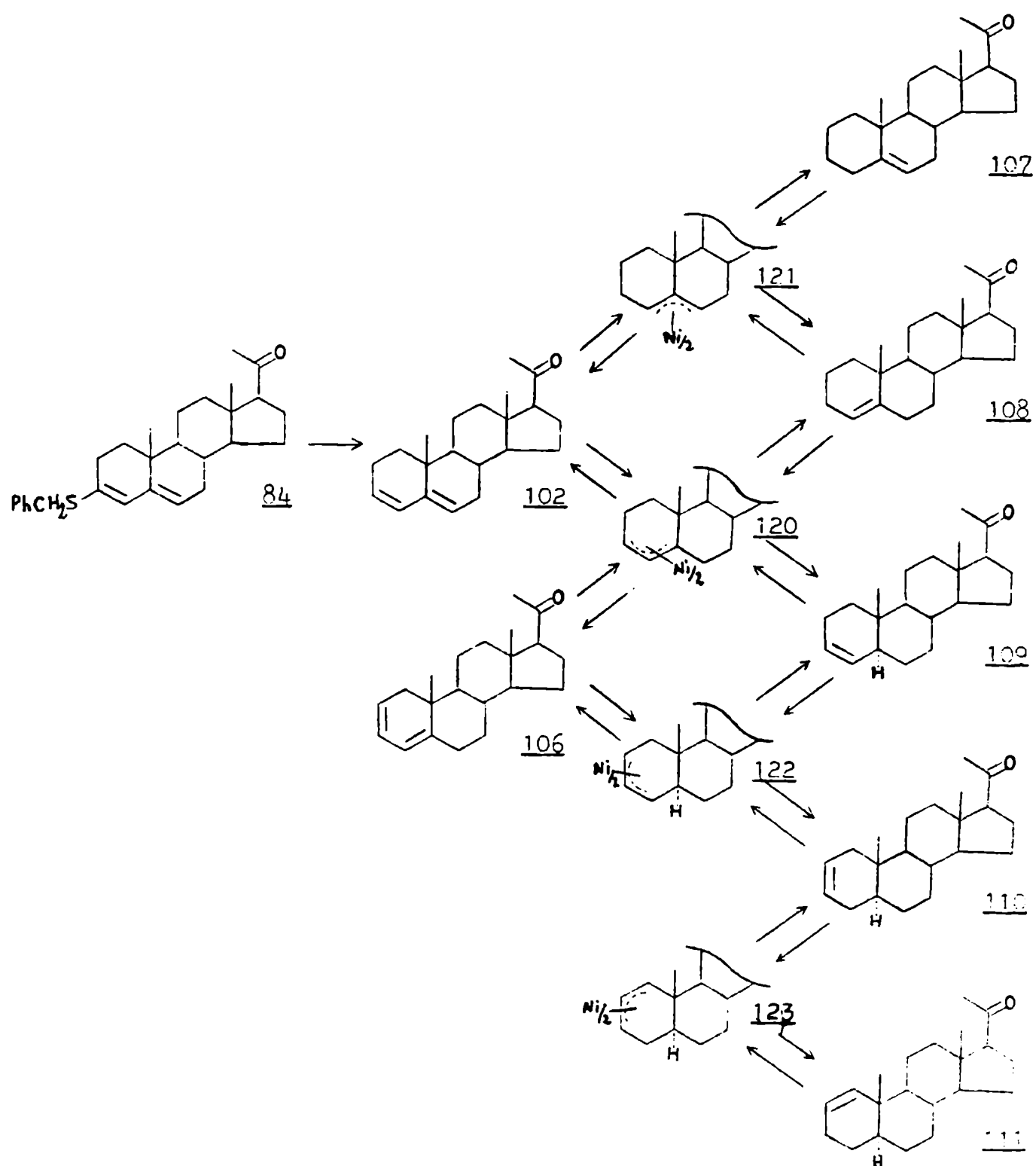
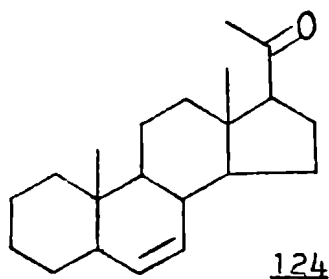
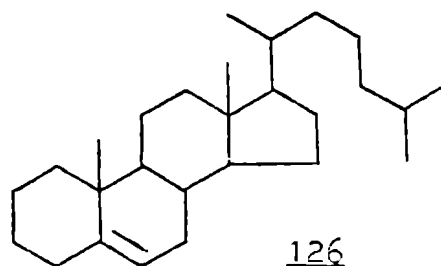
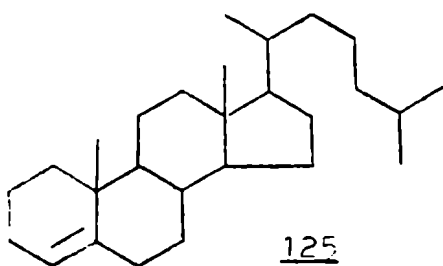


Figura 44: Mecanismo propuesto para la formación de los productos obtenidos en la reacción entre 3-benziltio-pregna-3,5-dien-20-ona y  $NiCl_2(DPEF)_2$  níquel Raney.



lace en posición 6,7 produciría la distorsión de los anillos A y C, debido a que los carbonos  $\alpha$  a la insaturación, C5 y C8, forman parte respectivamente de esos anillos y deben modificar su conformación.

El calentamiento de colest-4-eno (125) ó colest-5-eno (126) con ácido p-toluensulfónico produce una mezcla de dichos isómeros en relación 55:45 respectivamente <sup>101</sup>, notablemente similar a la relación observada entre pregn-4-en-20-ona (108) y pregn-5-en-20-ona (107) en la mezcla de reacción entre 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) y W-2 níquel Raney sin desactivar.



Finalmente resta explicar la formación de pregna-2,4-dien-20-ona (106).

Se encuentra descripta en literatura <sup>104</sup> la formación de cetonas diinsaturadas (4,6-dien-3-cetoesteroides) a partir de cetonas  $\alpha,\beta$  no saturadas (4-en-3-cetoesteroides), a través de un complejo  $\pi$ -enil-paladio (sobre los carbonos  $\alpha,\beta$  y  $\delta$  respecto del carbonilo)(compuesto 127) el cual sufre la deshidrogenación del carbono  $\alpha$  al mismo ( $\delta$  respecto del carbonilo)(figura 45).

En forma similar sería concebible la eliminación de un hidrógeno  $\alpha$  a un complejo  $\pi$ -enil-níquel dando lugar al dieno correspondiente. Los  $\pi$ -enil complejos 120 y 122 (sobre C3,4,5 y C2,3,4 respectivamente)(figura 44) serían los precursores posibles del 2,4-dieno 106, de los cuales se obtendría por eliminación de un hidrógeno de posiciones 2 y 5 respectivamente. Los complejos 120 y 121 (sobre C3,4,5 y C4,5,6 respectivamente)(figura 44) producirían el

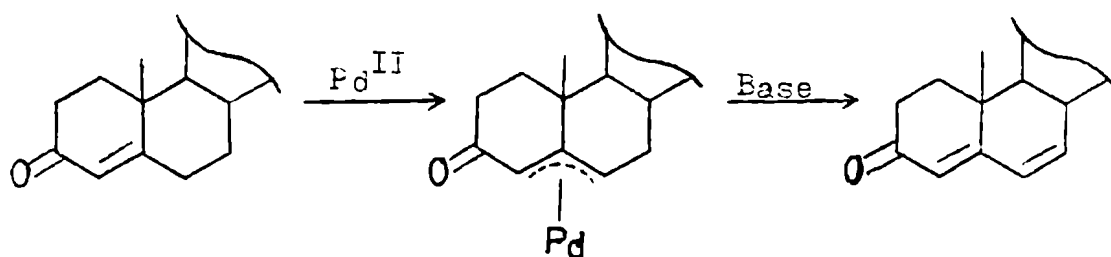


Figura 45: Síntesis de 4,6-dien-3-cetoesteroides a partir de los 4-en-3-cetoderivados correspondientes (referencia 104).

3,5-dienderivado 102 por eliminación de los hidrógenos 6 y 3 respectivamente, haciendo también reversible el primer paso de hidrogenación del dieno (figura 44). Este proceso nuevamente involucraría la eliminación de un hidrógeno activado.

La diferencia entre el níquel Raney desactivado y activo no solo radicaría pues en el mayor poder de hidrogenación del último, sino que este sería capaz de sustraer hidrógenos de posiciones labilizadas ( $\alpha$  a un doble enlace o a un complejo  $\pi$ -enil-níquel).

Finalmente, es probable que  $5\alpha$ -pregnan-20-ona (24) no provenga directamente de todos los esteroides monoinsaturados presentes sino que se originaría en la hidrogenación del 2-en-esteroide (110) (y en menor medida en sus  $\Delta^1$  y  $\Delta^3$ -análogos) debido a que este esteroide puede ser hidrogenado con mayor facilidad que pregn-4-en-20-ona (108) y pregn-5-en-20-ona (107), los cuales se irían transformando en 110 a medida que éste se consume. Un hecho que avala esta suposición es la no existencia en la mezcla de reacción entre 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) y W-2 níquel Raney, de  $5\beta$ -pregnan-20-ona (114), producto normal de hidrogenación de  $\Delta^4$ -esteroides con catalizadores heterogéneos, como se discutiera anteriormente.

La distinta relación  $\Delta^3/\Delta^4$  observada en el caso del uso de níquel Raney desactivado se debería a que en este caso la hidrogenación sería irreversible (dado que la forma desactivada sería incapaz de sustraer hidrógenos) y por lo tanto la relación estaría determinada por las velocidades de formación correspondientes (hidrogenación 1,2 frente a la 1,4) y no por la estabilidad relativa de los productos.

CAPITULO III

ANALISIS ESPECTROSCOPICO

DE PREGNANESTEROIDES

## ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE PREGNANESTEROIDES

### - Introducción:

En el transcurso del presente trabajo de tesis se utilizaron distintas técnicas espectroscópicas modernas, fundamentalmente Espectrometría de masas (e.m.), Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN- $^1\text{H}$ ) y de  $^{13}\text{C}$  (RMN- $^{13}\text{C}$ ). La información suministrada por las mismas fue de suma utilidad en distintos aspectos de la labor realizada, los cuales pueden clasificarse en los siguientes puntos:

- Seguimiento de secuencias de síntesis.
- Determinación de productos "anómalos" de reacción.
- Comparación de las características espectrales de esteroides relacionados.
- Análisis conformacional de pregn-4-en-3,20-dionas y pregna-1,4-dien-3,20-dionas.

Los dos primeros fueron discutidos en el transcurso del capítulo II, en la discusión de la síntesis de los distintos esteroides preparados. Los dos últimos puntos son el tema del presente capítulo.

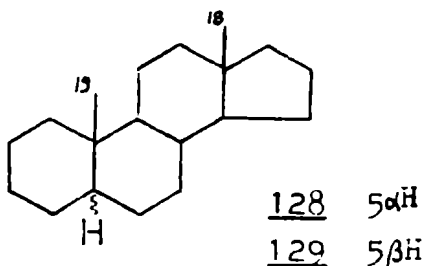


- Comparación de las características espectrales de esteroides relacionados: El análisis espectroscópico de series de esteroides relacionados resulta de suma importancia para la investigación del efecto de sustituyentes sobre los esqueletos de los mismos.

En base a los efectos de dichos sustituyentes sería luego posible la elucidación estructural de sustancias desconocidas (productos naturales o sintéticos). Por ejemplo, Zürcher <sup>38</sup> analizó el efecto de sustituyentes sobre el desplazamiento químico ( $\delta$ ) en RMN-<sup>1</sup>H de los metilos 18 y 19 de 5 $\alpha$ -androstando (128) y 5 $\beta$ -androstando (129), de gran utilidad ya que dichas señales son fácilmente localizables dentro del complejo esquema de señales provenientes del resto de los hidrógenos alifáticos del esteroide.

Respecto de la RMN-<sup>13</sup>C, también se encuentran tabulados los efectos de sustituyentes <sup>105</sup> sobre el esqueleto general del 5 $\alpha$ -androstando (128) y algunos sobre el 5 $\beta$ -esteroide 129.

En cuanto a la e.m. no es suficiente conocer el tipo de fragmentaciones que produce una determinada funcionalización en forma individual sobre el esqueleto esteroideal, sino que es imprescindible determinar como se modifican dichas rupturas por la presencia de otros grupos en la molécula.

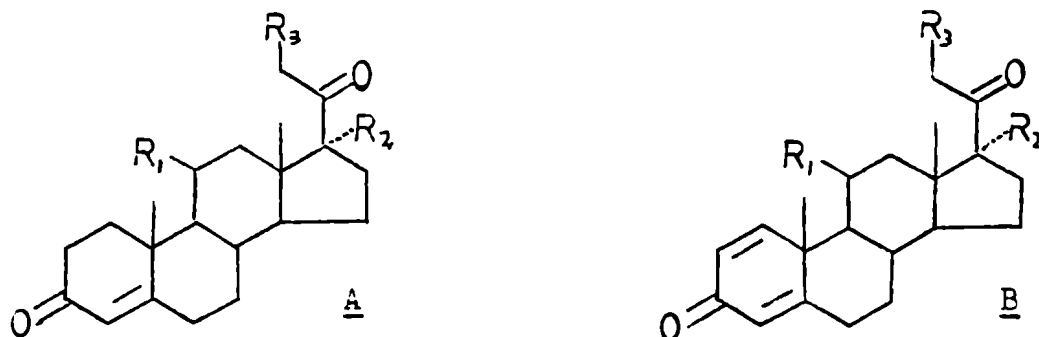


El análisis espectroscópico de series de esteroides relacionados es útil además para plantear o determinar la validez de teorías sobre el efecto de sustituyentes. Beierbeck y Saunders han propuesto una interesante teoría general sobre el efecto de sustituyentes en RMN- $^{13}\text{C}$  <sup>28,106-108</sup> sobre los carbonos  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\delta$  respecto del sustituyente. El cálculo del desplazamiento químico de los carbonos de una serie de esteroides y su comparación con los valores experimentales daría información sobre la validez o no de esta teoría y, por lo tanto, su utilidad o no en la predicción espectral.

Para los estudios sobre la relación entre la estructura esteroideal y la actividad glucocorticoide de los mismos, fue necesario disponer de pregn-4-en-3,20-dionas y pregna-1,4-dien-3,20-dionas hidroxiladas en posiciones 11 $\beta$ , 17 $\alpha$  y/o 21. Además se sintetizaron 20-metilen esteroides con distinta sustitución. Por último se disponía también de una serie de 20-cetopregnanos con distinto grado de insaturación y distinta localización de las mismas, correspondientes al producto de la reacción entre W-2 níquel Raney y 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84). Las estructuras de los esteroides de las series mencionadas se resumen en las figuras 46, 47 y 48 (la primera es repetición de la figura 1, pág. 4, presentándose aquí nuevamente para mayor comodidad).

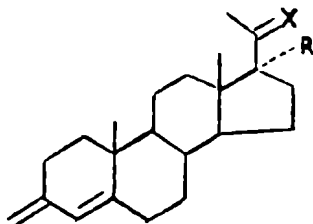
Resultó interesante, por lo tanto, el análisis comparativo de las series de esteroides disponibles respecto de sus espectros de masas, RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ . Los mismos se discuten en los puntos III.1.; III.2. y III.3. respectivamente.

Figura 46: Estructuras y nombres IUPAC de pregn-4-en- y pregna-1,4-dien-3-onas analizadas espectroscópicamente (e.m., RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ ).

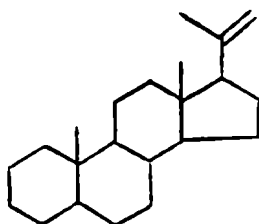


Nombre	Base	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<u>1</u> Pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	H	H	H
<u>2</u> 11 $\beta$ -hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	OH	H	H
<u>3</u> 17 $\alpha$ -hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	H	OH	H
<u>4</u> 21-hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	H	H	OH
<u>5</u> 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ -dihidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	OH	OH	H
<u>6</u> 11 $\beta$ , 21-dihidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	OH	H	OH
<u>7</u> 17 $\alpha$ , 21-dihidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	H	OH	OH
<u>8</u> 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-trihidroxi-pregn-4-en-3,20-diona	<u>A</u>	OH	OH	OH
<u>9</u> Pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>B</u>	H	H	H
<u>10</u> 11 $\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>B</u>	OH	H	H
<u>11</u> 17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>B</u>	H	OH	H
<u>12</u> 21-hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>B</u>	H	H	OH
<u>13</u> 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ -dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>B</u>	OH	OH	H
<u>14</u> 11 $\beta$ , 21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>B</u>	OH	H	OH
<u>15</u> 17 $\alpha$ , 21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>B</u>	H	OH	OH
<u>16</u> 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-trihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona	<u>B</u>	OH	OH	OH

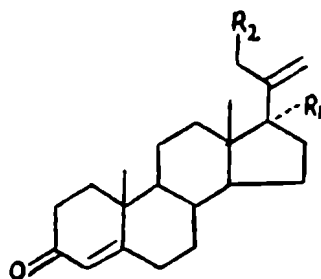
Figura 47: Estructuras y nombres IUPAC de los metilenoesteroides analizados espectroscópicamente (e.m., RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ ).



		X	R
<u>35</u>	20-metil-3-metilen-pregna-4,20-dieno	$\text{CH}_2$	H
<u>36</u>	17 $\alpha$ -hidroxi-20-metil-3-metilen-pregna-4,20-dieno	$\text{CH}_2$	OH
<u>37</u>	17 $\alpha$ -hidroxi-3-metilen-pregn-4-en-20-ona	O	OH

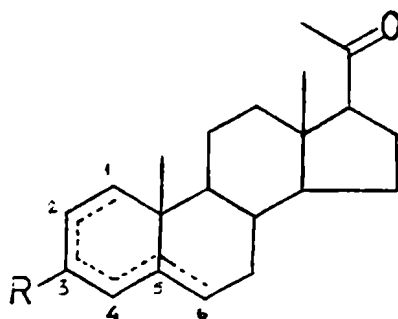


<u>38</u>	20-metil-pregn-20-eno
-----------	-----------------------



		$\text{R}_1$	$\text{R}_2$
<u>95</u>	20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona	H	H
<u>97</u>	17 $\alpha$ -hidroxi-20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona	OH	H
<u>98</u>	20-hidroximetil-pregna-4,20-dien-3-ona	H	OH
<u>99</u>	17 $\alpha$ -hidroxi-20-hidroximetil-pregna-4,20-dien-3-ona	OH	OH

Figura 48: Estructuras y nombres IUPAC de los 20-cetopregnanos saturados, mono y diinsaturados analizados espectroscópicamente (e.m., RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ ).



	Nombre	Insat.	R	H5
<u>84</u>	3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona	3,4/5,6	(a)	-
<u>102</u>	pregna-3,5-dien-20-ona	3,4/5,6	H	-
<u>106</u>	pregna-2,4-dien-20-ona	2,3/4,5	H	-
<u>107</u>	pregn-5-en-20-ona	5,6	H	-
<u>108</u>	pregn-4-en-20-ona	4,5	H	-
<u>109</u>	pregn-3-en-20-ona	3,4	H	5 $\alpha$
<u>110</u>	pregn-2-en-20-ona	2,3	H	5 $\alpha$
<u>111</u>	pregn-1-en-20-ona	1,2	H	5 $\alpha$
<u>24</u>	5 $\alpha$ -pregnan-20-ona	-	H	5 $\alpha$
<u>114</u>	5 $\beta$ -pregnan-20-ona	-	H	5 $\beta$

(a)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{S}-$

- Análisis conformacional de pregn-4-en-3,20-dionas y pregna-1,4-dien-3,20-dionas: En este aspecto de las posibles aplicaciones de los métodos espectroscópicos, la herramienta fundamental fue la espectrometría de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ .

Las estrategias utilizadas en este sentido pueden dividirse en tres grupos:

- Comparación directa del  $\delta$  de los carbonos esteroidales en función de la sustitución.
- Efecto del agregado de  $\text{CD}_3\text{OD}$  al solvente ( $\text{CDCl}_3$ ).
- Método de Woessner <sup>109</sup> basado en la determinación de tiempos de relajación y efecto nuclear Overhauser.

Los mismos se discuten en los puntos III.4.; III.5. y III.6 respectivamente. El primero fue empleado para la obtención de una "visión" de la conformación general del esqueleto esteroi-  
dal. El segundo brindó evidencias concluyentes acerca de la conformación de la cadena lateral y de la posible formación de puentes de hidrógeno intramoleculares entre los hidroxilos  $17\alpha$  y/o 21 con el carbonilo-20. Finalmente el tercer método fue utilizado para el análisis del grado de libertad de rotación de los metilos angulares y las interacciones que afectan al mismo <sup>110</sup>.

- Comparación de las características espectrales de esteroides relacionados:

III.1. Espectrometría de masas.

GENERALIDADES:

Budzikiewicz y Djerassi <sup>111</sup> estudiaron las rupturas características del esqueleto esteroideal, indicando las fragmentaciones para colestano (130) y androstano (128) presentadas en la figura 49.

La presencia de sustituyentes, además de impedir ciertas fragmentaciones e inducir otras nuevas, produce la modificación de la relación m/z de los fragmentos cargados que contienen los mismos.

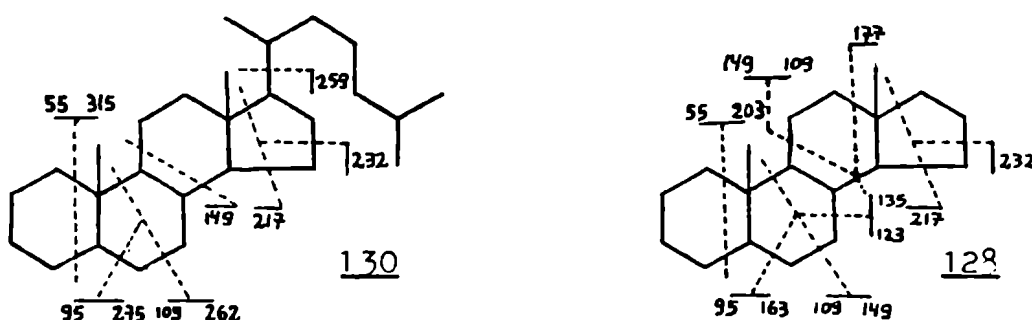


Figura 49: Fragmentaciones de colestano (130) y androstano (128) (referencia 111).

Djerassi y colaboradores <sup>95</sup> estudiaron también minuciosamente las principales fragmentaciones de pregnan-20-ona (24) cuyo espectro coincidió con el del producto principal de eliminación-hidrogenación de 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84). Mediante la marcación con deuterio de distintas posiciones esteroideas, dichos investigadores identificaron los fragmentos marcados formados, proponiendo mecanismos para justificar su formación.

La ruptura  $\alpha$  al carbonilo, característica de este grupo funcional determina el ión  $m/z$  43, de suma importancia. También se observa su contrapartida, el ión  $M-43$ .

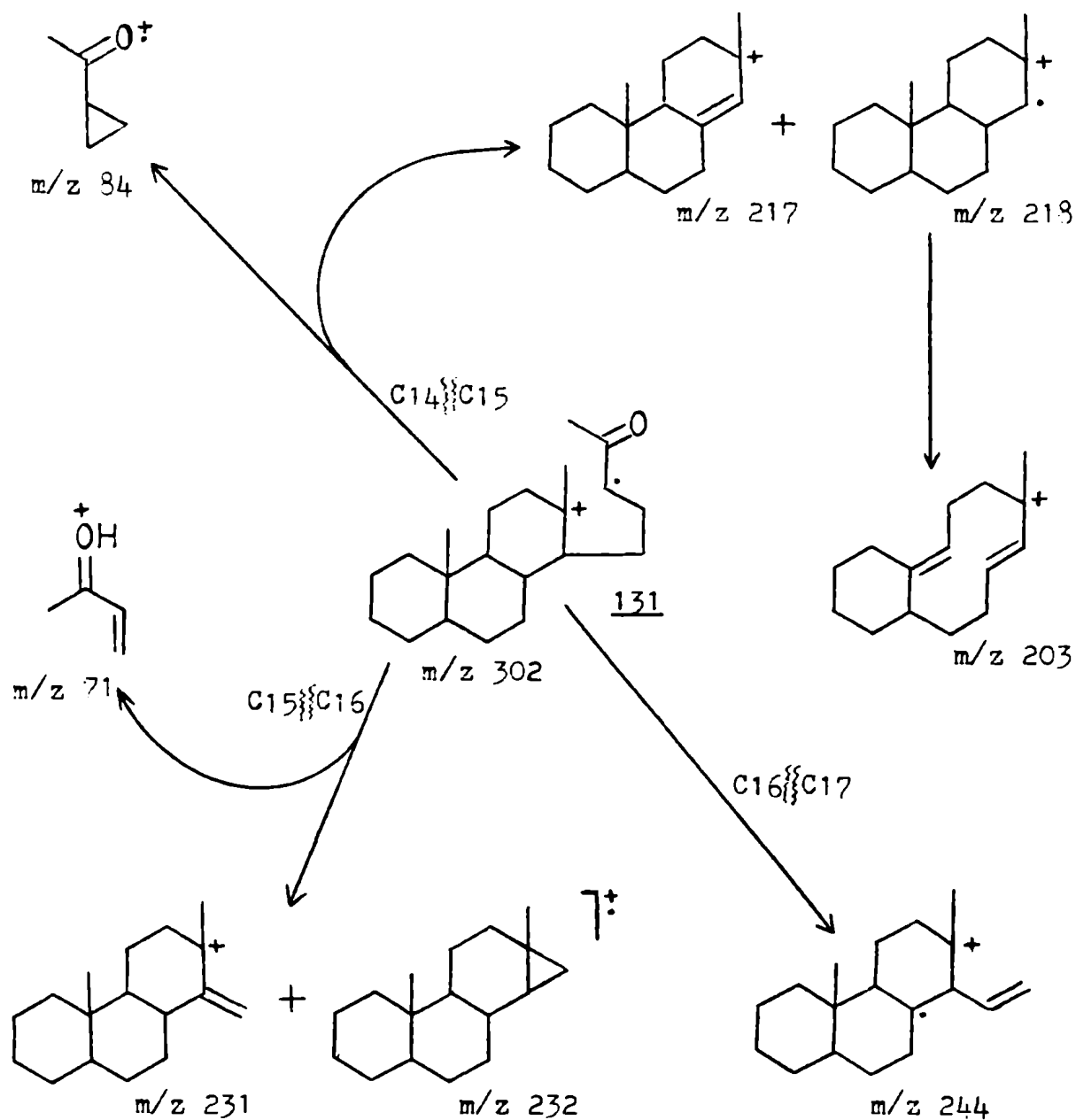
La mayoría de los fragmentos restantes pueden ser justificados por mecanismos cuyo primer paso sería la escisión de la unión C13-C17, dando lugar al ión molecular 131 mostrado en la figura 50. La ruptura de dicha unión estaría favorecida por la liberación de la tensión estérica del sistema trans-hidrindano. La presencia del carbonilo-20 permitiría además la estabilización del radical libre sobre C17. Los fragmentos se indican en la figura 50.

Von Unruh y Spiteller <sup>112</sup> propusieron otra ruptura del anillo D en 20-ceto-pregnanos, por escisión de las uniones C13-C17 y C16-C17 dando lugar al ión  $m/z$  58.

A diferencia de estos detallados estudios, no existe información en literatura acerca de las fragmentaciones debidas al grupo 20-metileno ( $\Delta^{20}$ -20-metil).

Brown y Djerassi <sup>66</sup> estudiaron en forma intensiva las fragmentaciones en e.m. de los sistemas  $\Delta^4$ -3-ceto y  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto, en esteroides donde los únicos grupos funcionales presentes eran dichos sistemas (androst -4-en-3-ona (132), pregn-4-en-3-ona (133),



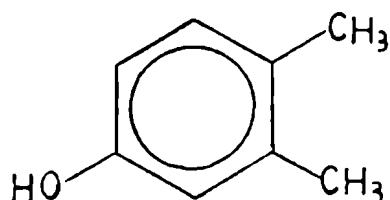


**Figura 50:** Fragmentaciones de pregnan-20-ona a partir de la escisión de la unión C13-C17 (referencia 111).

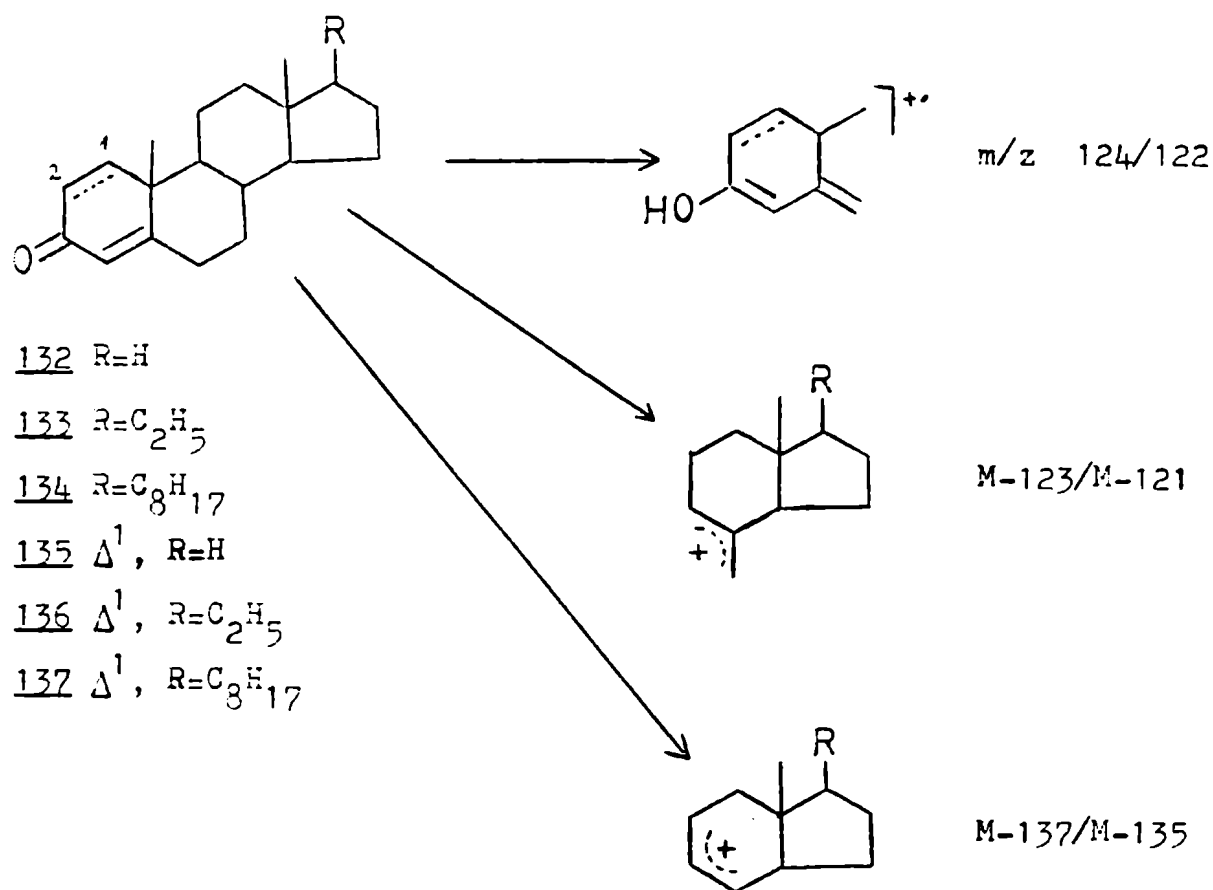
colest -4-en-3-ona (134), androsta-1,4-dien-3-ona (135), preña-1,4-dien-3-ona (136) y coesta-1,4-dien-3-ona (137) cuyas estructuras pueden verse en la figura 51).

El fragmento principal de estos espectros corresponde al ión  $m/z$  124-122, para  $\Delta^4$ -3-ceto y  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto derivados respectivamente, formado por ruptura de las uniones C9-C10 y C6-C7, con migración de dos átomos de hidrógeno hacia el fragmento cargado. Los autores determinaron que los hidrógenos que migran provienen casi exclusivamente de C8 y C11 (93 %) en el caso de los 1,4-dienos, mientras que en los 4-en-derivados, el origen del segundo hidrógeno (H11) es menos específico, existiendo importantes contribuciones provenientes de las posiciones 14 y 15.

La unión C9-C10 se encuentra fuertemente activada, especialmente en los  $\Delta^{1,4}$ -esteroides donde es doblemente alílica. Su desconexión como primer paso es la que origina la gran importancia del fragmento  $m/z$  122, así como la iniciadora de otros fragmentos que acompañan a este (picos de menor intensidad pero característicos de la sustitución del anillo A)(figura 51). El ión  $m/z$  122 es un tautómero del ión molecular del 3,4-dimetilfenol (138).



138



**Figura 51:** Principales fragmentaciones en  $\Delta^4$ -3-ceto y  $\Delta^1$ ,<sup>4</sup>-3-ceto esteroides (referencia 66).

Una ruptura de relativa importancia en los  $\Delta^4$ -3-ceto derivados, no existente en sus  $\Delta^1$ ,<sup>4</sup>-análogos, es la pérdida de 85 unidades de masa (u.m.) correspondiente a los carbonos 1, 2, 3, 10 y 19. El análisis de la relación genética del mismo indicó que no proviene del ión molecular sino del ión M-42 correspondiente a la pérdida de cetena <sup>66</sup>.

Por último, Brown y Djerassi <sup>66</sup> indicaron la presencia de un pequeño pico en la región de masas altas de los espectros de

los 1,4-dienos, correspondiente a M-41, debido a la pérdida de los carbonos 9, 11 y 12, sin transferencia neta de hidrógenos.

La serie de pregn-4-en-3,20-dionas (figura 46, pág. 130) no fue analizada en cuanto a la espectrometría de masas ya que había sido estudiada ampliamente con anterioridad <sup>113</sup>. En cambio solo existían datos desperdigados acerca del efecto de distintos sustituyentes sobre el sistema  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto, los cuales por su unicidad pueden llevar, como se verá más adelante, a conclusiones erróneas.

Por esa razón resultó interesante el análisis sistemático de la serie de pregn-1,4-dien-3,20-dionas de los cuales se disponía. El sistema  $\Delta^4$ -3-ceto se estudió en relación al sistema 20-metileno y distinto grado de hidroxilación en posiciones 17 y 21.

Finalmente la única ruptura descrita en el caso de 3-metilen- $\Delta^4$ -esteroides <sup>114</sup> corresponde a la escisión de las uniones C9-C10 y C6-C7, sin migración de átomos de hidrógeno. (figura 52).

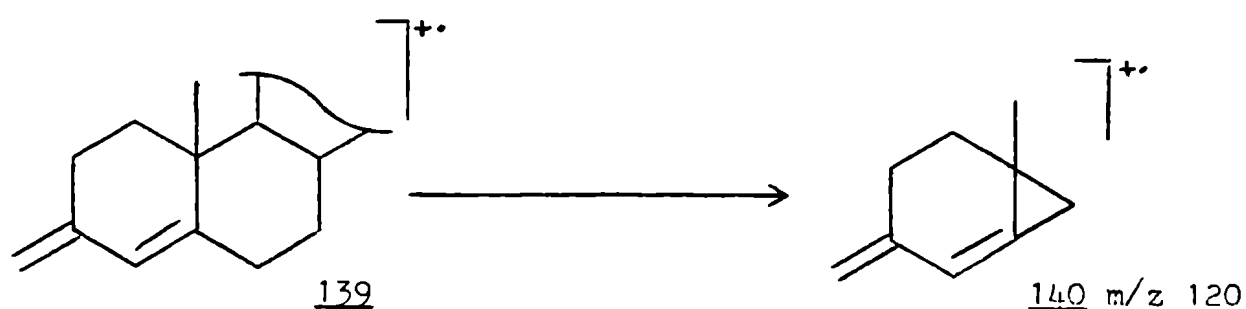


Figura 52: fragmentación de  $\Delta^4$ -3-metilen-esteroides (referencia 114).

Combinando las fragmentaciones debido al esqueleto esteroide con las propias de los distintos grupos funcionales discutidos anteriormente, es dado esperar las rupturas que se indican en la figura 53. Los fragmentos k y l no fueron sugeridos por Budzikiewicz y Djerassi <sup>111</sup> para el androstano. Sin embargo, dado que no existe ninguna razón aparente por la cual no puedan producirse dichas rupturas, se las plantea aquí como una posibilidad más a ser considerada. Del mismo modo se plantean las fragmentaciones m y s (figura 53).

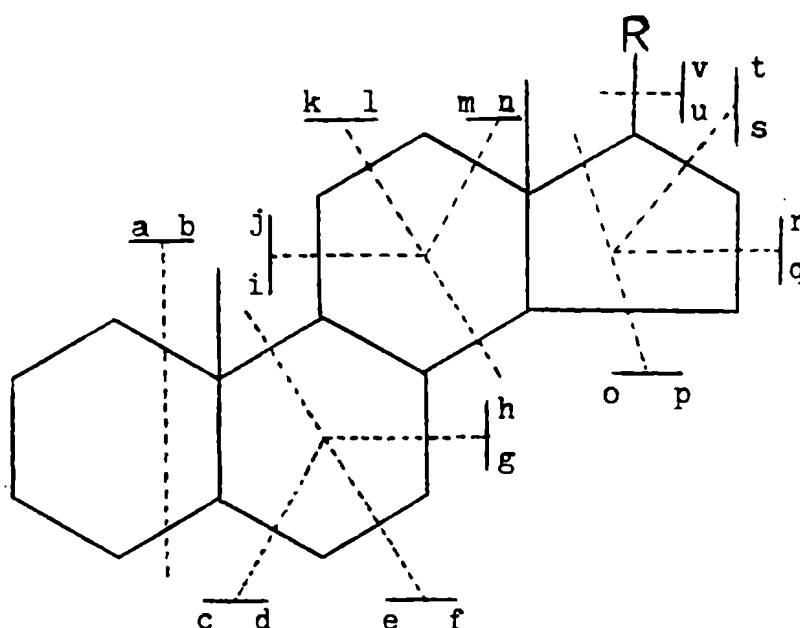


Figura 53: Posibles fragmentaciones de los pregnanos estudiados.

## RESULTADOS Y DISCUSION:

## III.1.1. Pregnan-20-onas saturadas, mono y diinsaturadas:

Constituyen esta serie  $5\alpha$ - y  $5\beta$ -pregnan-20-ona, los derivados monoinsaturados en posiciones 1, 2, 3, 4 y 5 del  $5\alpha$ -esteroide y los dienos pregna-2,4-dien-20-ona y pregna-3,5-dien-20-ona (ver estructuras correspondientes en figura 48, pág. 132).

En la tabla III-1 se detallan los iones más importantes encontrados en los espectros de masas de dichos compuestos. En la misma se indica a que fragmentación corresponde cada ión mediante las letras de la figura 53, y el número neto de átomos de hidrógeno que migran desde o hacia el ión (- ó + respectivamente). Esta convención se utilizó también en las tablas de los picos principales de los espectros de masas de los otros esteroides analizados (tablas III-2 y III-7).

Como puede verse en la tabla, en todos los casos el ión molecular ( $M^+$ ) constituyó un pico importante de intensidad relativa superior al 50 %, pico base en tres de ellos (compuestos 102, 109 y 111), de utilidad para determinar el grado de insaturación del esteroide.

Analizando la intensidad del pico M-15, en los esteroides no se observó un aumento en el caso de los compuestos con insaturaciones que involucran el C5 (compuestos 102, 106, 107 y 108) a pesar que la ruptura alílica del metilo-19 (Djerassi y colaboradores determinaron que ese es el metilo eliminado <sup>95</sup>) debería estar favorecida, según la teoría general de fragmentación de olefinas. Tam

Tabla III-1: Principales fragmentos en los espectros de masas de pregnan-20-onas <sup>a</sup>.

	102	106	107	108	109	110	111	24	114
M <sup>+</sup>	<u>298(100)</u>	298(86,0)	300(51,3)	300(59,0)	<u>300(100)</u>	300(79,7)	<u>300(100)</u>	302(74,3)	302(50,7)
M-15	283(35,7)	283(16,1)	285(16,9)	285(14,8)	285(26,3)	285(27,0)	285(48,6)	287(49,6)	287(24,2)
M-18	280(1,7)	280(2,6)	282(2,0)	282(1,5)	282(6,4)	282(7,4)	282(6,5)	284(30,7)	284(10,6)
M-33	265(5,6)	265(8,8)	267(7,0)	267(5,1)	267(10,9)	267(10,6)	267(12,3)	269(14,0)	269(4,7)
M	255(11,2)	255(12,1)	257(9,1)	257(12,4)	257(17,9)	257(18,6)	257(26,2)	259(16,1)	259(9,9)
L	--	--	244(1,9) <sup>b</sup>	--	246(14,9)	<u>246(100)<sup>c</sup></u>	246(5,9)	246(1,9) <sup>b</sup>	246(1,5) <sup>b</sup>
E	242(0,6)	242(1,0)	244(1,9) <sup>b</sup>	244(3,9)	244(5,2)	244(4,4)	244(7,9)	246(1,9) <sup>b</sup>	246(1,5) <sup>b</sup>
o-2H	240(8,1)	240(9,3)	242(3,4)	242(8,7)	242(9,3)	242(10,9)	242(12,8)	244(22,6)	244(18,2)
RDA-15 <sup>c</sup>						231(17,3)			
Q	228(4,7)	228(2,9)	230(4,8)	230(4,2)	230(6,3)	230(6,2)	230(11,9)	232(17,4)	232(13,4)
Q-H	227(4,7)	227(2,6)	229(3,8)	229(3,6)	229(5,7)	229(7,1)	229(10,7)	231(17,1)	231(12,6)
RDA-18 <sup>c</sup>						228(9,9)			
o-H <sup>d</sup>	213(26,4)	213(12,4)	215(12,5)	215(13,5)	215(31,4)	215(34,1)	215(40,6)	217(95,1)	217(64,2)
RDA-33 <sup>c</sup>						213(10,1)			
RDA/Q <sup>c</sup>						203(39,4)			
o-15	199(3,8)	199(4,2)	201(2,4)	201(3,3)	201(6,6)	201(9,6)	201(10,5)	203(8,9)	203(7,7)
o-H	191(2,7)	191(2,5)	191(1,3)	191(3,0)	191(3,6)	191(4,1)	191(5,9)	191(1,7)	191(1,0)
h-H	177(6,6)	177(1,8)	177(2,4)	177(2,0)	177(3,6)	177(5,1)	177(2,0)	177(4,1) <sup>b</sup>	177(3,3) <sup>b</sup>
RDA/Q <sup>c</sup>						176(13,6)			
RDA/Q-H <sup>c</sup>						175(14,4) <sup>b</sup>			
m-H	173(7,5)	173(7,9)	175(4,1)	175(5,6)	175(3,4)	175(14,4) <sup>b</sup>	175(3,0)	177(4,1) <sup>b</sup>	177(3,3) <sup>b</sup>
RDA/o-H <sup>c</sup>						161(37,8) <sup>b</sup>			
k-H	159(25,4)	159(9,2)	161(13,2)	161(10,4)	161(10,5)	161(37,8) <sup>b</sup>	161(12,7)	163(13,5)	163(7,3)
i-H	145(15,9)	145(32,0)	147(18,8)	147(27,3)	147(29,1)	147(31,0)	147(21,1)	149(34,8)	149(30,1)
l-H	137(2,9)	137(6,1)	137(3,3)	137(2,6)	137(3,4)	137(5,2)	137(3,5)	137(7,3)	137(4,3)
	123(2,7)	123(11,3)	123(5,1)	123(4,2)	123(6,2)	123(9,5)	123(4,4)	123(18,3)	123(9,8)
	121(39,8)	121(13,9)	121(11,0)	121(17,5)	121(19,9)	121(22,7)	121(36,2)	121(39,1)	121(20,0)
	119(10,2)	119(24,0)	119(10,3)	119(11,3)	119(16,0)	119(20,9)	119(13,7)	119(12,8)	119(7,9)
o+H	107(46,4)	107(38,3)	109(27,4)	109(31,9)	109(25,0)	109(32,3)	109(15,2)	111(6,6)	111(5,3)
o	106(2,6)	106(72,4)	108(14,5)	108(82,5)	108(54,8)	108(42,4)	108(68,2)	110(52,4)	110(38,4)
o-H	105(42,5)	105(66,5)	107(16,6)	107(19,5)	107(27,3)	107(40,0)	107(13,6)	109(16,8)	109(18,3)
	95(15,0)	95(31,7)	95(21,0)	95(19,7)	95(31,1)	95(40,2)	95(40,1)	95(53,5)	95(36,8)
	93(18,0)	93(23,0)	93(22,6)	93(32,7)	93(31,2)	93(40,5)	93(47,2)	93(29,3)	93(21,0)
	91(16,1)	91(64,2)	91(18,4)	91(23,3)	91(20,3)	91(27,7)	91(25,4)	91(10,1)	91(11,2)
p+H	85(13,7)	85(10,6)	85(28,3)	85(14,2)	85(22,6)	85(28,2)	85(10,1)	85(19,4)	85(19,2)
p	84(16,6)	84(13,5)	84(16,3)	84(16,7)	84(18,2)	84(36,4)	84(32,0)	<u>84(100)</u>	<u>84(100)</u>
p-H	83(14,3)	83(11,4)	83(10,0)	83(4,8)	83(7,6)	83(6,3)	--	83(16,5)	83(10,8)
r-H	71(6,5)	71(21,7)	71(11,6)	71(10,4)	71(13,8)	71(24,3)	71(6,0)	71(28,3)	71(29,3)
t-H	55(13,8)	55(22,2)	55(18,7)	55(21,8)	55(14,4)	55(16,1)	55(15,4)	55(28,8)	55(28,4)
v	43(93,0)	<u>43(100)</u>	<u>43(100)</u>	<u>43(100)</u>	43(63,3)	43(64,3)	43(50,3)	43(54,2)	43(69,9)

a) Valores de m/z y abundancia relativa (entre paréntesis). Ver estructuras correspondientes en figura 48, pág 132.

b) Coinciden

c) Retro Diels-Alder (RDA).

d) Acompañados de los picos correspondientes a o+H, o, o-2H y o-3H.

poco habría influencia de la insaturación en posición 1,2 (compuesto 111) donde el metilo nuevamente se encontraría en una posición teóricamente activada.

También se encontraron presentes los iones correspondientes a las pérdidas de agua (M-18) y (metilo + agua)(M-33).

i- Fragmentaciones de la cadena lateral: La ruptura  $\alpha$  al carbonilo pudo ser observada tanto con la retención de la carga en el carbonilo (m/z 43) como en la otra porción de la molécula (m/z 259; 257; 255)(fragmentos v y u respectivamente), mostrando este último la "marcación" con insaturaciones. El término "marcación" se refiere a que la presencia de la insaturación en un fragmento se hace evidente por la disminución de 2 u.m. en su relación m/z, en forma similar al aumento en la relación m/z de un ión que retiene en su estructura deuterios, por ejemplo, utilizados frecuentemente como marcadores.

El ión m/z 43 se presentó como otro de los más importantes de los espectros analizados (siempre mayor del 50 %). En tres casos este fragmento resultó ser el pico base del espectro (compuestos 106, 107 y 108).

ii. Fragmentaciones del anillo D: La ruptura o resultó ser la principal de esta región del esteroide, como se esperaba. Esta fragmentación presentó cinco señales en una distribución característica (o+H, o, o-H, o-2H, o-3H), siendo siempre el fragmento o-H el más importante de la serie, variando en los esteroides analizados entre 95,1 y 12,4 % (más importante en el caso de los esteroides satura-



dos).

Resultó también de suma importancia el ión correspondiente a la fragmentación anterior pero con retención de la carga sobre la porción oxigenada (fragmento p). Se observaron, junto con el ión resultante de una ruptura sin migración de hidrógeno (p), los iones p-H y p+H. Este fragmento dio lugar al pico base en los espectros de los esteroides saturados (compuestos 24 y 114), lo cual, asociado con la importancia de la ruptura o, indica lo favorecida que se encuentra en estos casos la escisión de las uniones C13-C17 y C14-C15. Una posible explicación de este hecho sería la no existencia en los esteroides saturados de otros grupos funcionales (dobles enlaces) que pudieran dirigir la fragmentación hacia otras regiones del esteroide, ya que el entorno donde se producen las rupturas o y p es el mismo para todos los esteroides analizados.

Las fragmentaciones del anillo D indicadas como q, q-H y r+H se observaron también en los espectros esteroidales. En todos los casos se produjo un pequeño aumento en la intensidad de estos picos en los espectros de los esteroides saturados, cabiendo la misma justificación propuesta para las rupturas o y p.

Por último se observaron las rupturas s (picos s y s-2H) y t (pico t-H) del anillo D. Este último pico resultó de poca utilidad debido a su baja relación  $m/z$ . El fragmento s en los esteroides saturados coincidió con el fragmento b correspondiente al anillo A. En cambio, en presencia de dobles enlaces se diferenciaron ambas rupturas, ya que el ión s sufrió el corrimiento de 2 y 4 u.m.

iii. Fragmentaciones del anillo A: El fragmento b solo resultó de importancia en el  $\Delta^2$ -esteroide 110, donde se transformó en el pico base del espectro. Este pico se originaría por una ruptura tipo Retro Diels Alder (RDA), sumamente favorecida (figura 54). A partir de dicho fragmento se generarían otros iones, por pérdida de metilo (RDA-15), agua (RDA-18), cadena lateral (RDA-43) y la fragmentación principal del anillo D (RDA/o-II). En base a la fragmentación b (RDA) y a los iones que de ella derivan, es posible diferenciar pregn-2-en-20-ona (110) del resto de los compuestos monoinsaturados.

El fragmento b fue el único proveniente de la ruptura del anillo A observado ya que su contraión (pico a) no fue observado, ni siquiera en el compuesto 110 donde correspondería a una ruptura tipo Retro Diels Alder con retención de la carga sobre la porción formada por los carbonos 1, 2, 3 y 4.

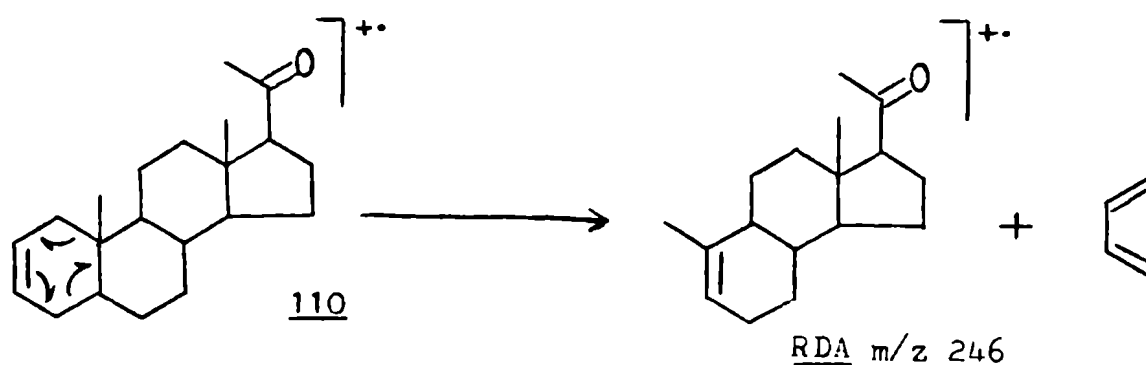


Figura 54: Ruptura tipo Retro Diels Alder (RDA) de pregn-2-en-20-ona (110).

iv. Fragmentaciones del anillo E: Las rupturas propuestas en todos los casos involucran la unión C9-C10. La escisión de la unión C5-C6 daría lugar a los fragmentos c y d. La presencia de un ión a  $m/z$  95 en los esteroides saturados (24 y 114), indicaría la ruptura c-H. Sin embargo dicho ión  $m/z$  95 apareció con similar intensidad en los otros 20-ceto esteroides analizados, cuando el fragmento c-H debería aparecer a  $m/z$  93 en los compuestos monoinsaturados en el anillo A (compuestos 108, 109, 110 y 111) y a 91 en el 2,4-dieno 106, mientras que en el caso de los  $\Delta^5$ -esteroides (compuestos 102 y 107) debería estar ausente dado que la ruptura implicaría la desconexión de dicha unión olefínica. En todos los esteroides analizados aparecieron señales a  $m/z$  95, 93 y 91 de intensidad similar, cualquiera sea el grado de insaturación y la localización de dicha insaturación. Por lo tanto no se trataría de la ruptura c sino de una ruptura general que daría lugar a fragmentos de fórmula  $C_7H_{11}$ ,  $C_7H_9$  y  $C_7H_7$  (este último correspondería al ión tropilio, de suma estabilidad).

Tampoco se observó la fragmentación d. En cambio la fragmentación e, correspondiente a la desconexión de las uniones C9-C10 y C6-C7, produjo un pico importante (siempre mayor del 40 %) salvo en el caso de los  $\Delta^5$ -esteroides 102 y 107. El hecho que apareciera este ión con menor importancia para los  $\Delta^5$ -derivados se debería a que la fragmentación e implicaría en esos casos la ruptura de una unión vinílica (C6-C7), poco favorecida. En cambio en el caso del  $\Delta^1$  y los  $\Delta^4$ -esteroides (compuestos 111, 106 y 108 respectivamente) la fragmentación se encontraría favorecida por la labilización de las uniones C9-C10 (en todos los casos) y C6-C7 (en los

$\Delta^4$ -derivados) por ser estas de tipo alílicas, a tal punto que el fragmento  $m/z$  108 se transformó en el segundo pico en importancia en los espectros de los esteroides monoinsaturados 108 y 111.

La ruptura e sin migración de átomos de hidrógeno, apareció acompañada por los iones e+H y e-H relativamente importantes. Djerassi y colaboradores <sup>95</sup> indicaron que en pregnan-20-ona (24) el fragmento e-H estaría favorecido por la labilidad de la unión C13-C17, la cual provocaría un corrimiento electrónico que favorecería la migración de H5 hacia la posición 9, junto con la ruptura de la unión C6-C7 (figura 55). Sin embargo, de producirse este proceso, la ruptura e-H no sería posible en el caso de los  $\Delta^4$ -esteroides 106 y 108, donde los iones  $m/z$  105 y 107 respectivamente resultaron algo más intensos que el correspondiente ión  $m/z$  109 en los esteroides saturados 24 y 114. En cambio un mecanismo con ruptura simple de las uniones alílicas C9-C10 y C6-C7 parece más razonable (al menos en los  $\Delta^4$ -esteroides).

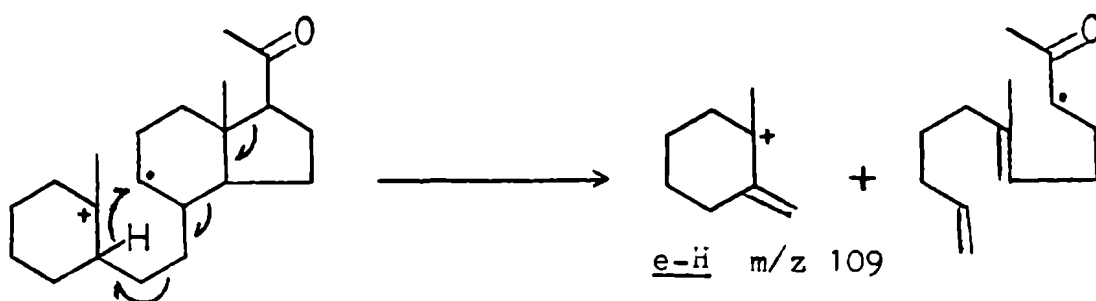


Figura 55: Mecanismo de la ruptura e-H en pregnan-20-ona (24) propuesto por Djerassi y colaboradores (referencia 95).

La pérdida ó ganancia de un átomo de hidrógeno permitiría el reordenamiento de los  $\Delta^5$ -esteroides 102 y 107, produciéndose las rupturas e-H y e+H, cuando no aparece el fragmento e.

La importancia del ión e-H en el caso de los dienos 102 y 106 podría deberse a la contribución en la intensidad del mismo del metiltropilio ( $m/z$  105) el cual apareció también en todos los otros esteroides.

El contraión correspondiente al fragmento e, es decir el fragmento f, el cual retiene la carga sobre el fragmento oxigenado se produjo en todos los casos con la pérdida de un átomo de hidrógeno por el mismo (f-H)(picos poco intensos aunque detectables).

Del mismo modo se observó con poca intensidad la ruptura del anillo B correspondiente al fragmento h.

Por último, la ruptura g (contraparte del anterior) sin migración de hidrógeno, daría lugar a los iones  $m/z$  124, 122 y 120 para los esteroides saturados, mono y diinsaturados respectivamente. En la misma región aparecería el ión correspondiente a la fragmentación n del anillo C ( $m/z$  124). En los espectros se observaron picos importantes a  $m/z$  121 y 119, y en menor importancia a  $m/z$  123 para todos los esteroides. Es poco probable que estos picos proviniessen de las fragmentaciones indicadas ya que de ser una ruptura de tipo n donde la relación  $m/z$  es igual para todos los esteroides analizados, esta debería producirse con la migración de 3 y 5 átomos de hidrógeno hacia el fragmento neutro (corresponderían a los picos n-3H y n-5H) en el caso de los picos más importantes. Por otro lado, si se plantea una ruptura g-H sería posible justificar los iones  $m/z$  123 en los compuestos saturados, los  $m/z$  121 en los

monoinsaturados y los  $m/z$  119 en los dienos, pero no así el resto de los iones presentes, fundamentalmente los iones  $m/z$  121 en los esteroides saturados y dienos, y  $m/z$  119 en los primeros, los cuales en algunos casos aparecieron con mayor intensidad que los picos justificados por g-H en dichos compuestos.

Cabe destacar que los fragmentos  $m/z$  120-122 correspondientes a una ruptura de tipo Retro Diels Alder de los  $\Delta^5$ -esteroides 102 y 107 <sup>115</sup> aparecieron como picos de baja intensidad, no diferenciables de los iones de igual relación  $m/z$  en los otros esteroides. Lo propio sucedió con el fragmento  $m/z$  178 correspondiente a la misma ruptura pero con la carga sobre el fragmento oxigenado (fragmento h).

Zaretskii destacó en su libro sobre espectrometría de masas de esteroides <sup>114</sup>, la presencia de un grupo de fragmentos a  $m/z$  118-122, de intensidad similar, en gran variedad de esteroides insaturados en distintas posiciones, lo cual haría de poca utilidad cualquier señal presente en esta región del espectro, para la localización de un doble enlace.

v. Fragmentaciones del anillo C: La ruptura m, contrapartida del

fragmento n, ya analizado anteriormente, apareció como un pico de poca importancia (m-H), aunque siempre observable. La mayor intensidad de este pico en el caso del  $\Delta^2$ -esteroide podría deberse a la contribución adicional al mismo del fragmento  $m/z$  175 correspondiente a la ruptura del anillo A de tipo Retro Diels Alder seguida de la ruptura del anillo D del tipo q-H (fragmento RDA/q-H). Avala esta hipótesis la presencia de un ión de intensidad similar

con una relación  $m/z$  176 (fragmento RDA/a), lo cual está de acuerdo con la similar intensidad con que aparecieron los fragmentos a y a-H del esteroide.

La ruptura más importante del anillo C correspondió a la escisión de las uniones C9-C11 y C8-C14, con pérdida de un átomo de hidrógeno y retención de la carga sobre el fragmento formado por los anillos A y B (ruptura i-H), mientras que aquel donde la carga permanece sobre el fragmento oxigenado (i) no se observó.

Las dos fragmentaciones restantes provienen de la ruptura de las uniones C11-C12 y C8-C14, encontrándose ambas presentes con la pérdida de un átomo de hidrógeno por el fragmento cargado (k-H y l-H). La mayor importancia relativa del ión k-H en pregn-2-en-20-ona (110) se debería nuevamente a la contribución de un fragmento derivado de la ruptura Retro Diels Alder del anillo A (en este caso seguida de la fragmentación o-H del anillo D)(RDA/o-H).

vi. Diferenciación de los esteroides analizados: De la discusión

anterior se deduce que sería fácil determinar el grado de insaturación del esteroide gracias a la presencia de un importante ión molecular, confirmado por los distintos picos que contienen en su estructura los anillos A y B (rupturas e, i, o, a y s).

No se observaron diferencias significativas entre los espectros de 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -pregnan-20-ona (24 y 114 respectivamente), lo cual era de esperarse debido a la poca utilidad de la espectrometría de masas en el análisis conformacional molecular.

Pregn-2-en-20-ona (110) es el único de los esteroides monoinsaturados fácilmente diferenciable, gracias a la fragmenta-

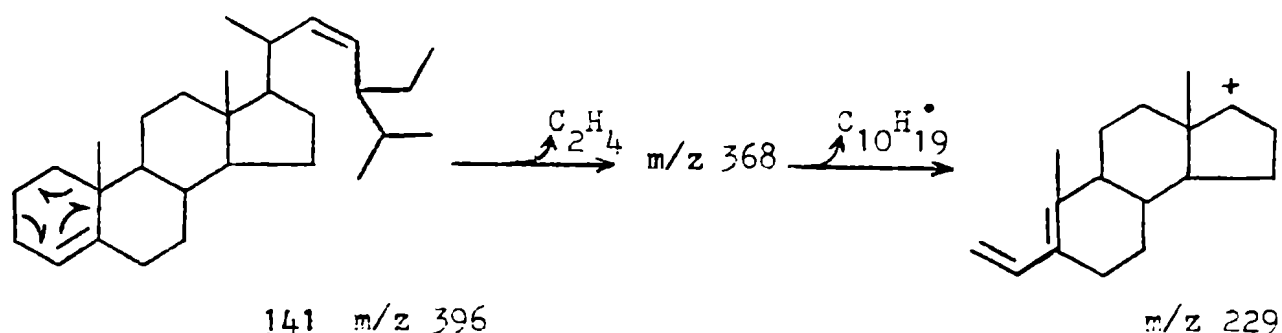
ción RDA del anillo A ( $m/z$  246) que constituyó el pico base del espectro. Además presentó otros fragmentos derivados del ión anterior (RDA-15, RDA-18, RDA-33, RDA/o-H, RDA/q, RDA/q-H, RDA/u).

También es posible diferenciar pregn-5-en-20-ona (107) del resto debido a la poca abundancia del ión  $m/z$  108 (15 % frente a 42/83 %) ya que esta implicaría la desconexión de la unión vinílica C6-C7. El resto de las rupturas no presentaron diferencias de significación. No se observó, como se indicara anteriormente, la ruptura de tipo Retro Diels Alder del anillo B, propuesta por Reichstein y colaboradores <sup>115</sup> en el caso de 3-hidroxi-5-enesteroides.

No se observaron diferencias de significación entre las fragmentaciones de pregn-3-en-20-ona (109) y pregn-4-en-20-ona (108), por lo cual no sería posible diferenciarlos entre sí por espectrometría de masas.

En el espectro de masa del estigmasta-4,22-dieno (141) Reed <sup>116</sup> propuso que la pérdida de 28 u.m. que se observaba en el mismo se debía a la eliminación de los carbonos 1 y 2 del anillo A por una ruptura de tipo Retro Diels Alder, la cual era seguida por la escisión de la cadena lateral para dar el ión  $m/z$  229. (figura 56). En el espectro de pregn-4-en-20-ona (108) no se observó ninguna señal a  $m/z$  272, correspondiente a la pérdida de 28 u.m., mientras que el fragmento correspondiente a  $m/z$  229 corresponde a la ruptura q-H. De la no existencia del fragmento M-28 se desprende que probablemente la justificación del mismo en el caso del estigmasta-4,22-dieno (141) no fuera la correcta dado que el cambio de cadena lateral no debería afectar dicha ruptura. Una posible jus





**Figura 56:** Fragmentación del estigmasta-4,22-dieno (141)(referencia 116).

tificación sería la pérdida de 28 u.m. de la cadena lateral (por ejemplo del etilo alílico), mientras que el fragmento supuestamente proveniente de la pérdida de la cadena lateral de M-28, se produciría por una ruptura similar a la q-H de los 20-cetopregnanos.

La diferenciación entre los dienos es posible gracias a la ruptura e del mismo modo que en pregn-5-en-20-ona (107), ya que este fragmento en el 3,5-dieno 102 apareció con muy baja intensidad (2,6 %) debido a que en la ruptura se encuentra involucrada una unión vinílica.

Respecto de las rupturas del esqueleto esteroideal que no estaban indicadas en trabajos previos (k, l, m y s) <sup>111</sup>, todas ellas se encontraban presentes en los espectros analizados, siendo particularmente importante la k-H (intensidad mayor del 10 %) y la s-2H (mayor del 8 %). En cambio no se observaron las fragmentaciones a,

d y i indicadas para el esqueleto esteroideal. Estos fragmentos fal tantes, así como m (de poca importancia) y g (cuya presencia no es segura) corresponden a rupturas de dos uniones exocíclicas, donde el fragmento neutro corresponde al ciclo intacto, mientras que la carga permanece en porciones que poseen una cadena lineal de al me nos dos átomos de carbono (a sería una cadena lineal de 4 carbonos). La pérdida de dicha cadena lateral (como etileno por ejemplo) con tribuiría entonces a la intensidad de iones de menor relación  $m/z$ , formados también por fragmentación directa. Es así, por ejemplo, que la pérdida de dos átomos de carbono en el fragmento m-H (poco importante) daría lugar a un ión  $m/z$  149, 147 ó 145, según el gra do de insaturación, equivalente al que se obtiene por fragmentación i-H (ruptura más importante del anillo C).

### III.1.2. Pregna-1,4-dien-3,20-dionas:

Comprenden este grupo preгна-1,4-dien-3,20-diona (9) y sus mono, di y trihidroxiderivados en posiciones  $11\beta$ ,  $17\alpha$  y 21, los iones principales de cuyos espectros se resumen en la tabla III-2.

Respecto de los 20-cetopregnanos analizados anteriormen te, no se produjeron en los  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroides las rupturas a/ b y c/d ya que para ello sería necesaria la desconexión de uniones olefinicas (C1-C2 y C4-C5) o vinílicas (C5-C6) respectivamente.

Los espectros de  $17\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (11) <sup>117</sup> y  $11\beta,17\alpha,21$ -trihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (16) <sup>118</sup> se encuentran descriptos en literatura, siendo concordantes con los detallados en esta tesis.

Tabla III-2: Principales fragmentos en los espectros de masas de progna-1,4-dien-3,20-dionas <sup>a</sup>.

Fragm.	9	10	11	12	13	14	15	16
M <sup>+</sup>	312(17,4)	328(7,8)	328(11,4)	328(16,6)	344(36,4)	344(8,6)	344(12,6)	360(13,0)
M-15	297(1,4)	313(0,8)	--	313(0,9)	--	329(0,4)	329(0,4)	--
M-18	294(1,1)	310(2,0)	310(3,3)	310(0,3)	326(3,1)	326(3,7)	326(3,9)	342(3,9)
M-31	--	297(0,6)	--	297(15,3)	--	313(11,0)	313(0,8)	--
M-33	279(1,0)	295(1,4)	--	295(1,8)	311(0,9)	311(5,1)	311(0,7)	327(0,6)
M	269(2,3)	285(0,6)	285(33,1)	269(13,8)	301(2,8)	285(3,8)	285(42,7)	301(17,6)
M-18	251(0,6)	267(1,5)	267(25,0)	251(0,9)	283(8,0)	267(18,6)	267(40,4)	283(16,0)
g	242(0,6)	--	242(6,1)	242(0,7)	258(4,3)	--	242(11,9)	258(1,1)
g-H	241(1,0)	--	241(2,5)	241(1,9)	257(3,6)	257(0,9)	241(4,5)	257(2,3)
M-36 <sup>b</sup>	--	--	--	--	265(5,7)	249(0,8)	--	265(15,0)
Q-II <sup>b</sup>	227(5,5)	243(0,4)	227(11,7)	227(2,6)	243(1,5)	243(0,4)	227(18,6)	243(1,5)
Q-H-18 <sup>b</sup>	209(0,8)	225(7,3)	209(1,7)	209(0,6)	225(19,8)	225(7,9)	209(2,0) <sup>c</sup>	225(30,0) <sup>c</sup>
f-H	191(5,5)	207(23,1)	207(4,1)	207(3,1)	223(14,6)	223(24,0)	223(6,6)	239(12,9)
h-H	177(3,3)	193(6,8)	--	193(1,4)	209(7,3)	209(8,9)	209(2,0) <sup>c</sup>	225(30,0) <sup>c</sup>
k-H	173(12,5)	189(3,1)	173(17,4)	173(16,1)	189(2,1)	189(1,3)	173(27,1)	189(2,5)
l-H	161(5,2)	161(4,9)	161(7,1)	161(9,6)	161(8,7)	161(10,8)	161(11,6)	161(13,1)
l-H	159(6,7)	159(5,6)	159(14,2)	159(11,1)	159(10,5)	159(16,4)	159(27,0)	159(9,1)
l-H	137(1,6)	137(2,5)	153(1,4)	153(1,2)	153(0,9)	153(1,6)	169(1,6)	169(1,3)
g+II	135(15,0)	135(8,1)	135(16,4)	135(30,6)	135(22,6)	135(16,4)	135(29,5)	135(30,1)
g	134(9,9)	134(9,6)	134(8,4)	134(7,3)	134(14,3)	134(8,2)	134(15,4)	134(14,9)
g-H	133(12,1)	133(5,3)	133(11,7)	133(9,4)	133(8,3)	133(9,2)	133(17,8)	133(10,5)
e+2H	122(100)	122(100)	122(38,7)	122(100)	122(82,4)	122(100)	122(89,7)	122(100)
e+H	121(45,5)	121(33,2)	121(100)	121(80,6)	121(100)	121(87,9)	121(100)	121(99,4)
p+H	85(8,2)	85(11,6)	--	101(0,9)	101(0,6)	101(2,7)	117(10,3)	117(7,1)
r+H	71(6,0)	71(8,1)	87(7,6)	87(1,5)	87(11,0)	87(2,2)	103(5,2)	103(2,5)
y	43(85,1)	43(68,6)	43(90,8)	59(0,4)	43(24,8)	59(0,5)	59(0,9)	59(0,7)
				43(7,0)	43(19,5)	43(64,4)		43(21,8)

a) Valores de m/z y abundancia relativa (entre paréntesis). Ver estructuras en figura 46, pág. 130.

b) Acompañados de los picos correspondientes a Q+II, Q, Q-2H y Q-3H. c) Diferentes fragmentos de igual m/z.

El ión molecular se encontró presente (7,8-36,4 %), sufriendo los esperados corrimientos en 16 u.m. por cada hidroxilo presente, respecto del valor base  $m/z$  312 correspondiente a pregna-1,4-dien-3,20-diona (9). En base a este ión, los esteroides pueden ser diferenciados fácilmente por su grado de hidroxilación ( $m/z$  312 en 9, 328 en los monohidroxiderivados, 344 en los dihidroxiderivados, 360 en 16).

Confirman estas diferencias los iones derivados del ión molecular por pérdida de fragmentos pequeños (M-15, M-18, M-33) presentes en casi todos los casos. Estos iones aparecieron con baja intensidad (menos del 5,2 %) aunque fácilmente observables en la región de masas altas del espectro, libre de otros fragmentos cargados (salvo M-31 en el caso de algunos 21-hidroxiesteroides, como se discutirá más adelante).

i. Fragmentaciones del anillo B: La fragmentación e dio lugar al pico base en todos los espectros a través de los iones  $m/z$  122 ó 121. El primero de estos es el fragmento característico del sistema  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto el cual, como se indicara anteriormente, se produce por la desconexión de las uniones C9-C10 y C6-C7, concomitantemente con la migración de dos átomos de hidrógeno hacia el fragmento cargado.

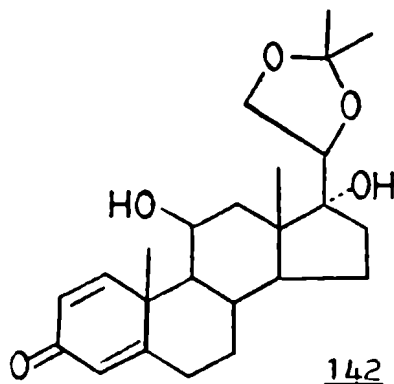
Resultó sorprendente que en el caso de los esteroides 17 $\alpha$ -hidroxilados, el pico base fuera el  $m/z$  121 (salvo en 16 donde los iones 121 y 122 aparecieron prácticamente con igual intensidad).

En cambio no se observó un aumento en la abundancia relativa del ión  $m/z$  121 debido a la presencia del hidroxilo 11 $\beta$  como

sucede en el caso del ión  $m/z$  123 en los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides <sup>113</sup>.

Se encuentra descrito en literatura <sup>119</sup> el espectro de masas del 20,21-acetónido de  $11\beta,17\alpha,20,21$ -tetrahidroxi-pregna-1,4-dien-3-ona (142), en el cual el ión  $m/z$  121 presenta una abundancia relativa superior a la del ión  $m/z$  122. Dicha importancia del pico resultante de la fragmentación  $e+H$ , fue correlacionada con la presencia del hidroxilo  $11\beta$ , por similitud con lo que sucede en los  $\Delta^4$ -3-ceto esteroides <sup>113</sup>. Sin embargo el compuesto analizado también presenta en su estructura un hidroxilo en posición  $17\alpha$  el cual, según los resultados del análisis de distintos  $17\alpha$ -hidroxi- $\Delta^1,4$ -3-cetoes teroides aquí descrito, sería el verdadero responsable de la modificación del espectro. El error indicado proviene de extrapolar resultados válidos en otras estructuras basándose solo en un esteroide.

La confirmación del origen común (fragmentación  $e$ ) de los iones  $m/z$  121 y 122 en preña-1,4-dien-3,20-diona (9) (como representante de los 17-desoxiesteroides) y su  $17\alpha$ -hidroxiderivado 11 (como ejemplo de los 17-hidroxilados), se realizó mediante el análisis de los espectros de masas de dichos esteroides marcados con deuterio,



como se discutirá más adelante (pág. 163). Allí se presenta también un mecanismo que justificaría el efecto "a larga distancia" del hidroxilo-17 $\alpha$  sobre la ruptura del anillo B.

El ión m/z 122 es un tautómero del ión molecular del 3,4-dimetilfenol (138), como se indicara anteriormente, encontrándose presentes en los espectros de masa de los  $\Delta^1,4$ -3-cetoesteroides analizados, los iones correspondientes a la fragmentación de dicho compuesto aromático (m/z 107; 81; 55; 53; 79; 77; 67; 95; 93; 91) (ver rupturas generales de fenoles y toluenos <sup>120</sup>).

El fragmento f-H, resultante de la escisión de las mismas uniones que en el caso anterior pero donde la carga se ubica en la porción formada por los anillos C y D, característico también del sistema  $\Delta^1,4$ -3-ceto (M-121), también se encontró en los esteroides analizados.

Esta ruptura estaría favorecida por la presencia del hidroxilo 11 $\beta$  como puede verse en la tabla III-2 (3,1-6,6 % en los 11-desoxiesteroides frente a 12,9-23,1 en los 11-hidroxilados). Además de la modificación de la intensidad relativa de este fragmento según la sustitución, también se vio afectado el valor de relación m/z al cual apareció ya que las posiciones de hidroxilación analizadas se encuentran todas en la porción del esteroide que forma parte del ión resultante.

Lo mismo sucedió en el caso del fragmento h-H, también característico del sistema 1,4-dien-3-ceto del anillo A (M-135), en cuanto al aumento de intensidad en presencia del hidroxilo 11 $\beta$  (6,8-8,9 % frente a 0-3,3 % en los 11-desoxiderivados) y al corrimiento de la señal por hidroxilación.

La elevada intensidad en el caso de 16 para este ión se debería a que coincide con el fragmento formado por la ruptura o, seguida de pérdida de agua, el cual se discutirá más adelante.

El aumento de intensidad del fragmento h-H por la presencia de un hidroxilo en posición  $11\beta$  se debería a la mejor estabilización de la carga, gracias a la posibilidad de su localización sobre el oxígeno (estructura 143, figura 57), dando lugar a una estructura de "orbitales llenos".

La contrapartida de este ión, es decir la fragmentación g, dio lugar a tres señales importantes en esa región del espectro (5,3-30,6 %) correspondientes a g-H, g y g+H ( $m/z$  133, 134 y 135 respectivamente). Este fragmento no fue indicado como característico del sistema  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto <sup>66</sup>, pese a que el carácter doblemente alílico de la unión C9-C10 favorece notablemente la fragmentación, dando lugar a picos de fácil asignación, a diferencia del caso de los 20-ceto-pregnanos analizados anteriormente (pág. 148) cu

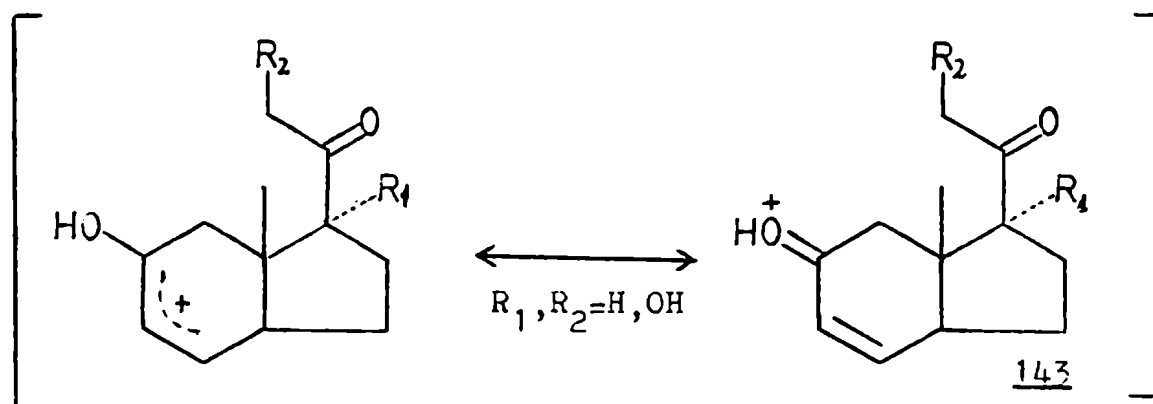


Figura 57: Estabilización del fragmento h-H en  $11\beta$ -hidroxiesteroides.

ya asignación no resultó concluyente.

El último fragmento que implica la desconexión de la unión C9-C10, indicado por Brown y Djerassi <sup>66</sup> como característico de  $\Delta^1,4$ -3-cetoesteroides (de baja intensidad) es el correspondiente a la pérdida de C9-C11-C12 (41 u.m., salvo en el caso de los 11-hidroxiesteroides donde sería de 57 u.m.) el cual no se observó en los espectros de los compuestos analizados.

ii. Fragmentaciones del anillo C: La ruptura i se produjo con la migración neta de un átomo de hidrógeno desde o hacia la porción cargada (i-H, i+H respectivamente).

Al igual que en el caso de los 20-cetopregnanos, la ruptura i no se observó en los espectros de masas de pregna-1,4-dien-3,20-dionas, ni siquiera en el caso de los 11 $\beta$ -hidroxiderivados en los cuales, según la teoría básica de la espectrometría de masas, la desconexión de la unión C9-C11 estaría favorecida por tratarse de una ruptura  $\alpha$  al hidroxilo.

En cambio, si se produjo la ruptura k, con pérdida de un hidrógeno por el fragmento cargado, dando lugar al ión  $m/z$  173 en los 11-desoxiesteroides y  $m/z$  189 en los 11-hidroxilados. Este fragmento resultó más intenso en el primer grupo de pregnanos (12,5-27,1 %) que en los 11 $\beta$ -hidroxiderivados (1,3-3,1 %), pese a que la unión C9-C11 estaría activada por ser  $\alpha$  al hidroxilo.

La contrapartida del fragmento anterior (ruptura l-H) dio origen a iones de muy baja intensidad (0,9-2,5 %), mientras que los debidos a las rupturas m y n no se observaron en los espectros. En el caso de los 20-cetopregnanos fueron observados los fragmentos l



y m aunque con baja intensidad (menor del 10 %), mientras que la presencia del fragmento n resultó incierta (ver pág. 149). Por lo tanto resulta lógico que estas rupturas de poca monta, debidas al esqueleto esteroideal en si, desaparecieran cuando se funcionalizó el mismo con grupos que dirigen poderosamente las fragmentaciones como lo hace el sistema  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto.

iii. Fragmentaciones del anillo D: Este grupo de rupturas está dirigido por la labilización de la unión C13-C17 debido a la presencia del carbonilo-20, como se discutiera en el caso de los 20-cetopregnanos.

La fragmentación o solo resultó de importancia en presencia de un hidroxilo en posición 17 $\alpha$  el cual favorece aún más la ruptura de la unión C13-C17. Sin embargo fue posible identificar estas iones en todos los casos debido a que aparecen en una región libre de otras señales, y a la distribución característica de los cinco picos que se producen (correspondientes a los fragmentos o+H, o, o-H, o-2H y o-3H). En presencia de un hidroxilo en posición 11 las especies cargadas anteriores aparecieron con 18 u.m. menos que las esperadas, debido a la pérdida de agua, desapareciendo los fragmentos o como tales, siendo reemplazados por la serie o-18.

La ruptura p, de suma importancia en los 20-cetopregnanos, solo pudo ser observada en el caso de pregna-1,4-dien-3,20-diona (9) y su 11 $\beta$ -hidroxiderivado 10, donde se produjo con ganancia de un átomo de hidrógeno por la especie cargada (p+H). La abundancia del ión m/z 117 en el caso de 17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (15) y su 11 $\beta$ -hidroxiderivado 16 no puede ser asignada al fragmento

n+H ya que también apareció en los espectros del resto de los esteroides, en abundancia similar. Una posible explicación para la no existencia de estos iones en el caso de los esteroides  $17\alpha$  y/o 21 hidroxilados, podría encontrarse en la complejidad adicional de la especie formada en dichas circunstancias ( $\alpha$ -hidroxi y  $\alpha,\alpha$ -dihidroxi cetonas de 5 átomos de carbono) la cual se fragmentaría fácilmente.

La ruptura q (sin migración de hidrógeno o con la pérdida de un átomo de hidrógeno por la especie cargada) apareció solo con cierta importancia en el caso de los  $17\alpha$ -hidroxiesteroides, mientras que su contrapartida, el fragmento r, resultó detectable en todos los espectros analizados. Las restantes rupturas del anillo D (s y t) no fueron observadas en los espectros analizados.

iv. Fragmentaciones de la cadena lateral: Como era de esperarse,

la fragmentación u, se vió favorecida por la presencia de un hidroxilo en posición  $17\alpha$ , donde también se observó el fragmento u-18 (pérdida de agua). En presencia de un hidroxilo en posición  $11\beta$  también se observó el fragmento u-18 e inclusive el u-36 en los esteroides hidroxilados en posiciones  $11\beta$  y  $17\alpha$ .

La presencia de un hidroxilo en posición 21 también favoreció la formación del fragmento u, a través de la pérdida secuencial de  $\text{CH}_2\text{OH}^\bullet$  (31 u.m.) y CO <sup>113</sup>. La pérdida de 31 u.m. mencionada dio lugar a un pico de cierta importancia (11,0-15,3 %) solo cuando no se encontraba presente simultaneamente el hidroxilo  $17\alpha$ . Esto puede explicarse fácilmente teniendo en cuenta que este último grupo funcional favorece la fragmentación u. Por lo tanto si se formara el ión M-31, este perdería inmediatamente CO para dar u.

Por último, el fragmento y resultó de suma importancia solo en el caso de los 21-desoxiesteroides ( $m/z$  43), pero despreciable en presencia de dicho sustituyente ( $m/z$  59). Sin embargo es los últimos esteroides presentaron un ión a  $m/z$  43 de origen incierto, que impidió utilizar dicho ión como diagnóstico de 21-desoxiesteroides.

v. Elucidación estructural: Al respecto es posible resumir los siguientes hechos indicativos de la sustitución en pregna-1,4-dien-3,20-diona:

- La existencia de los iones  $m/z$  121/122, 133/134/135 y 159/161 (rupturas e, g, i) indican que la única funcionalidad presente en los anillos A y B del esteroide es el sistema  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto.
- La presencia de cinco iones centrados en  $m/z$  227 (ruptura o) indica que la única funcionalidad existente en los anillos A, B y C corresponde al sistema  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto.
- La presencia de un hidroxilo en posición 11 puede ser detectada debido a la ausencia del ión  $m/z$  173 (ruptura k-H; 10-30 %), ratificada por el aumento en la intensidad de los iones M-121 y M-135 (rupturas f y h) y el reemplazo del fragmento o ( $m/z$  227 en los 11-desoxiesteroides) por o-18 ( $m/z$  225 en los 11 $\beta$ -hidroxiderivados).
- La presencia de un hidroxilo en posición 17 $\alpha$  puede ser inferida en forma indirecta por el aumento de la importancia del ión  $m/z$

121 (ruptura e) y confirmada por el incremento de las señales correspondientes a las fragmentaciones o (o-18 en presencia de un hidroxilo 11 $\beta$ ) y u (acompañado siempre por el ión u-18 y, en el caso de los 11-hidroxilados, del ión u-36).

- La presencia de un hidroxilo en posición 21 puede ser inferida en base a la presencia del ión M-31, aunque solo en ausencia de otro hidroxilo en posición 17 $\alpha$ , ya que este último hace desaparecer el pico diagnóstico.

vi. Origen del pico m/z 121: Para determinar si el origen del ión m/z 121 era el mismo que el del ión m/z 122, es decir a través de la fragmentación e, se realizaron y analizaron los espectros de 4,6,6,17,21,21,21-d<sub>7</sub>-pregna-1,4-dien-3,20-diona (20) y 4,6,6,21,21,21-d<sub>6</sub>-17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (21) (ver estructuras correspondientes en figura 19, pág. 64). De este modo se analizó el origen de dicho ión tanto en un caso donde se trata del pico base del espectro (11) como cuando el pico base es el ión m/z 122 (9). Así fue posible determinar si el origen del incremento en el ión m/z 121 se debía también a la fragmentación e.

La tabla III-3 presenta los porcentajes de deuteración en los esteroides marcados, determinados en base a las intensidades de las señales que aparecen en la región del ión molecular, teniendo en cuenta la relación M/M+1/M+2 en el esteroide sin marcar.

Para el estudio encarado, fue necesaria la discriminación de la deuteración en las distintas posiciones marcadas (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub> y C<sub>21</sub> en 21 y C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>17</sub> y C<sub>21</sub> en 20).

Tabla III-3: Porcentajes de deuteración en  $d_7$ -pregna-1,4-dien-3,20-diona (70) y  $d_5$ -17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (71).

	$d_0$	$d_1$	$d_2$	$d_3$	$d_4$	$d_5$	$d_6$	$d_7$
<u>70</u>	-	-	3	10	24	29	28	4
<u>71</u>	-	-	6	42	17	30	5	-

La deuteración en posición 21 se determinó fácilmente en base al corrimiento del fragmento y correspondiente a la cadena lateral. En ambos esteroides marcados desapareció la señal a  $m/z$  43, siendo reemplazada por otras dos a  $m/z$  45-46, correspondientes a compuestos di y trideuterados en posición 21. En base a la intensidad relativa de dichas señales se calculó la proporción de dichas especies. Los resultados se resumen en la tabla III-4.

La deuteración en posición 17 de 70 se calculó gracias al corrimiento sufrido por el ión f-H debido a la marcación ( $m/z$

Tabla III-4: Discriminación de la deuteración de 70 y 71 en las distintas posiciones marcadas.

	C21				C17		C4,6			
	$d_0$	$d_1$	$d_2$	$d_3$	$d_0$	$d_1$	$d_0$	$d_1$	$d_2$	$d_3$
<u>70</u>	-	-	25	75	15	85	24	25	43	7
<u>71</u>	-	-	13	87	-	-	46	15	34	6

193-195), teniendo en cuenta los porcentajes calculados para la deuteración sobre C21. La marcación sobre dicho fragmento puede ser discriminada según se indica en la tabla III-5.

La contribución de las especies indicadas con (°) en la tabla es nula dado que, según lo calculado anteriormente, no existen especies no deuteradas o monodeuteradas en C21 (solo aparecen aquellas que poseen 2 ó 3 deuterios en dicha posición). Por lo tanto es correcto que no se observaran señales en las relaciones  $m/z$  correspondientes al fragmento f-H monodeuterado ó sin marcar.

Se determinó en que proporción se encontraba presente la especie  $21d_2-17d_1$  en base al porcentaje en que apareció el fragmento tetradeuterado (especie  $21d_3-17d_1$ ) ya que deben guardar una re-

Tabla III-5: Discriminación de las especies deuteradas constituyentes del fragmento f-H en 70.

general	C21	C17	% general
$d_4$	$d_3$	$d_1$	63
$d_3$	$d_2$ $d_3$	$d_1$ $d_0$	32
$d_2$	$d_1$ $d_2$	$d_1$ (°) $d_0$	5
$d_1$	$d_0$ $d_1$	$d_1$ (°) $d_0$ (°)	-
$d_0$	$d_0$	$d_0$ (°)	-

lación entre sí igual a la proporción general  $d_3/d_2$  calculada para la deuteración de la posición 21. Por lo tanto corresponde a dicha especie un 21 % del total de los esteroides presentes, mientras que el resto de las especies trideuteradas (11 %) lo constituye la especie  $21d_3-17d_0$ . Del mismo modo se calculó el porcentaje que le correspondería a la especie  $21d_2-17d_0$ , a partir de  $21d_3-17d_0$  y la relación  $d_3/d_2$  en C21. El valor calculado (4 %) se encuentra en muy buena aproximación con el valor observado (5 %).

La relación existente entre las especies  $21d_3-17d_1$  y  $21d_3-17d_0$  es la que guardan entre sí todas las especies monodeuteradas y sin deuterar en posición 17. Por lo tanto el 85 % del esteroide presente se encontraría deuterado en posición 17 mientras que el 15 % restante no presentaría marca sobre dicho carbono (tabla III-4).

La marcación de las posiciones 4 y 6 se determinó en base a los porcentajes de deuteración del ión molecular, teniendo en cuenta los porcentajes de deuteración determinados para las posiciones 17 y 21, trabajando en forma similar al cálculo de la deuteración sobre C17 a partir del fragmento f-H (si bien se debió trabajar con tres "posiciones" de marcación y especies con hasta 7 deuterios). Los resultados se resumen en la tabla III-4.

El cálculo de la deuteración en posiciones 4 y 6 en 21 se realizó en forma mucho más simple a partir del ión proveniente de la fragmentación u, en base a la intensidad de las señales que aparecieron en la región correspondiente del espectro ( $m/z$  285-289) (Tabla III-4). La relación  $d_0-d_3$  en C4,6 fue confirmada a partir de los iones correspondientes a u-18.

En el caso de 71 no se utilizó la estrategia seguida en el caso de 70 debido a que el método empleado resulta mucho más directo y simple, y a que se trabajó con señales de mayor intensidad, aumentando la confiabilidad de los resultados.

Este tipo de cálculo no pudo ser utilizado en el caso de 70 dado que en ese caso, en el fragmento y también se encontraría presente la marca sobre C17, mientras que un cálculo indirecto (conociendo la deuteración en esta última posición) resultaría con mucho error debido a la baja intensidad de las señales correspondientes.

Como verificación de que los valores calculados para la deuteración en posiciones 4, 6 y 21 de 71 eran correctos, se calculó la relación que debería existir entre las distintas señales de la región del ión molecular, hallándose una buena correlación entre las mismas y los valores experimentales.

Suponiendo que el origen del ión  $m/z$  121 fuese el mismo que el del fragmento  $m/z$  122, es decir a través de la ruptura e pero con migración de un solo átomo de hidrógeno, se calculó la intensidad de las señales en los esteroides marcados (70 y 71) debidas a los iones que aparecen a  $m/z$  121-122-123 en los compuestos sin marcar (9 y 11). Para ello se adjudicó un valor arbitrario a uno de dichos fragmentos con un determinado grado de marcación. En base a la relación  $d_0-d_3$  en posiciones 4 y 6 calculada y a la relación 121-123 en el esteroide sin marcar, se calculó la contribución de cada uno de los fragmentos en cada uno de sus estados de deuteración, sumándose las especies de igual relación  $m/z$ . Finalmente las intensidades totales calculadas se normalizaron a un valor adecuado



para su comparación con las intensidades observadas. Como puede verse en la tabla III-6, la correlación entre los valores calculados y las intensidades observadas, resultó muy buena, apoyando fuertemente la posibilidad de que el origen del ión  $m/z$  121 fuera el mismo que el  $m/z$  122, es decir la ruptura e ( $m/z$  121 = e+H;  $m/z$  122 = e+2H).

La razón por la cual la ruptura e se vio afectada tan drásticamente debido a la presencia de un hidroxilo en el otro extremo de la molécula esteroideal no resulta evidente observando la relación espacial de los grupos involucrados. Sin embargo se encuentra una posible explicación cuando se analiza la influencia del hidroxilo-17 $\alpha$  sobre otras fragmentaciones del esteroide.

Tabla III-6: Cálculo de la intensidad de los picos provenientes del fragmento e en los esteroides marcados (70 y 71) y comparación con los valores observados.

$m/z$	<u>e+H</u>	<u>e+2H</u>	<u>e+3H</u>	<u>70</u>		<u>71</u>	
				Calc.	Obs.	Calc.	Obs.
126			$d_3$	3	3	1	0
125		$d_3$	$d_2$	33	25	13	13
124	$d_3$	$d_2$	$d_1$	100	100	44	47
123	$d_2$	$d_1$	$d_0$	98	91	97	84
122	$d_1$	$d_0$		68	76	68	78
121	$d_0$			21	17	100	100

La presencia de un hidroxilo en posición  $17\alpha$  favorece, como se indicara anteriormente, la ruptura del anillo D que da lugar al ión  $m/z$  227 (fragmento o-H). Dicho ión presenta dos características de suma importancia:

- Carece del H8, uno de los que migra durante la formación del ión  $m/z$  122, ya que el mismo es transferido a la posición 17 en el proceso de fragmentación <sup>66</sup>.
- En su lugar existe un doble enlace C8-C14 y, en posición alílica al mismo (C13) la carga del ión.

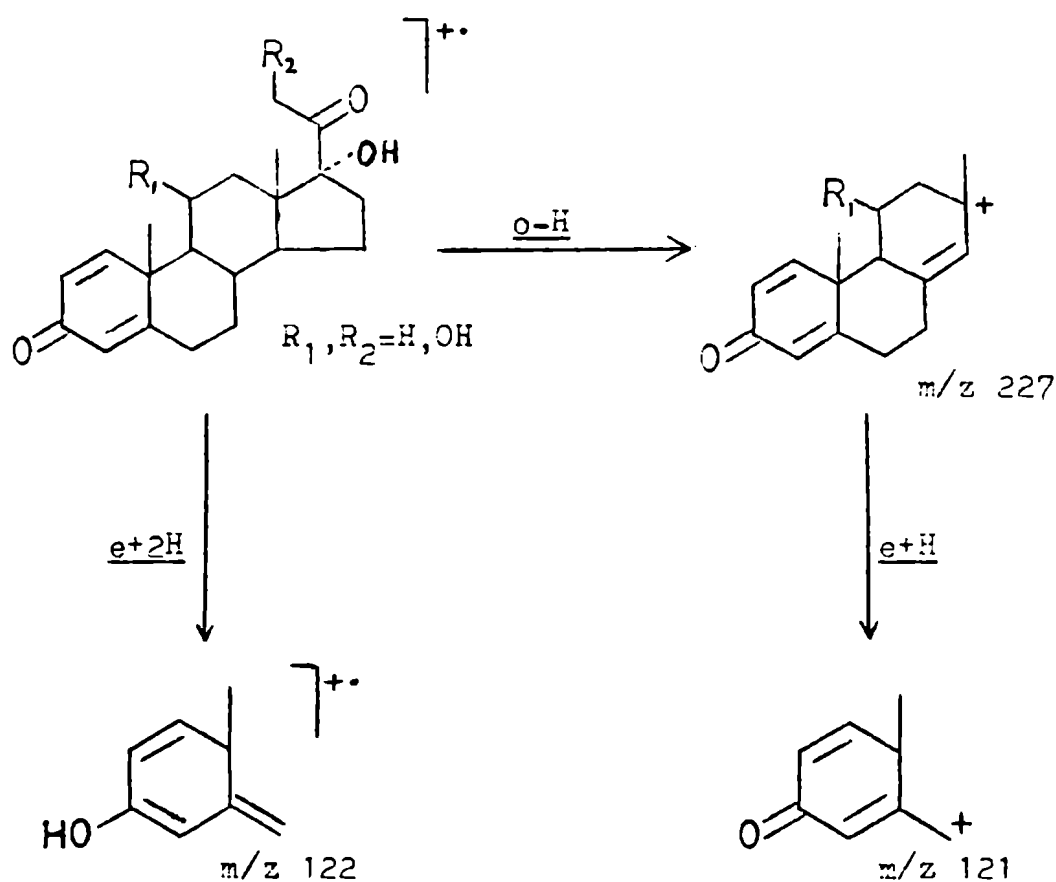
La primera particularidad del fragmento imposibilita la ruptura del mismo para dar el ión  $m/z$  122, proceso además desfavorable ya que implicaría la formación de un ión radical a partir de un ión. En cambio sería factible la formación de otro ión simple.

Por otro lado el doble enlace C8-C14 produce la labilización de la unión C6-C7 (una de las que sufren la desconexión en la ruptura e) ya que esta se encuentra en posición alílica.

Djerassi y colaboradores <sup>121</sup> encontraron que la ruptura e en  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides sustituidos con un grupo ceto en posición 6 se producía con la migración de un solo átomo de hidrógeno ( $m/z$  137), debido a que la presencia de dicho grupo produciría la suficiente activación de la unión C6-C7 como para que la ruptura tuviera lugar directamente (ruptura  $\alpha$  a una cetona) sin que fuera necesaria la migración de un segundo átomo de hidrógeno. Incluso la presencia de sustituyentes alquílicos sobre C6 favorece la ruptura del

anillo B con migración de un solo átomo de hidrógeno <sup>122</sup>, aunque la doble migración aún predomina en este caso.

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos puede afirmarse que el ión  $m/z$  122 provendría, como está establecido en colest-1,4-dien-3-ona (137) por análisis directo de iones hijos (DADI), de la fragmentación directa del ión molecular <sup>66</sup>, mientras que el ión  $m/z$  121 provendría del fragmento o-H (o-H-18 en el caso de los  $11\beta$ -hidroxiesteroides) como se indica en la figura 58.



**Figura 58:** Origen propuesto para los iones  $m/z$  121 y 122 en  $17\alpha$ -hidroxiesteroides.

Más aún, el incremento en importancia del ión  $m/z$  121 no sería exclusivo del hidroxilo  $17\alpha$ , ya que cualquier factor que incrementa la fragmentación g produciría el mismo efecto sobre la distribución de los iones formados en la ruptura e. Es más, cualquier factor que active suficientemente la unión C6-C7, facilitando su ruptura directa (sin la segunda migración de hidrógeno), también produciría el mismo efecto.

### III.1.3. 20-metilenesteroides:

Comprenden este grupo de compuestos los 20-metilenpregnanos con distinta sustitución indicados en la figura 47 (pág. 131).

La tabla III-7 resume las principales fragmentaciones de los mismos. En todos los casos el ión molecular dio lugar a un pico importante, siendo en varios casos el pico base del espectro (compuestos 85, 88, 95, 97, 98).

En la región de masas altas se observaron también las pérdidas de metilo, agua y metilo+agua (estos dos últimos no se observaron en 85 y 88 los cuales no poseen oxígeno en sus estructuras). La pérdida de agua resultó particularmente importante en el dimetilenanálogo de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (86)(96 %), dando lugar a una serie de fragmentos derivados del mismo, 18 u.m. por debajo de los fragmentos derivados del ión molecular, de mayor importancia que estos últimos (se observaron las rupturas f, h, i, l y n con y sin pérdida de agua).

En los 3-metilen- $\Delta^4$ -esteroides (85 y 86) aparecieron también los fragmentos M-2H (especialmente en 86) los cuales generaron

Tabla III-7: Principales fragmentos en los espectros de masas de  
20-metilenesteroides <sup>a</sup>.

	<u>38</u>	<u>35</u>	<u>36</u>	<u>35</u>	<u>27</u>	<u>28</u>	<u>22</u>
<u>M<sup>+</sup></u>	<u>320(100)</u>	<u>310(100)</u>	<u>326(74,3)</u>	<u>312(100)</u>	<u>328(100)</u>	<u>323(100)</u>	<u>344(15,5)</u>
<u>M-2H</u>		<u>308(2,3)</u>	<u>324(15,7)</u>				
<u>M-15</u>	<u>285(39,0)</u>	<u>295(37,9)</u>	<u>311(14,6)</u>	<u>297(17,4)</u>	<u>313(6,2)</u>	<u>313(21,1)</u>	<u>329(26,2)</u>
<u>M-18</u>	--	--	<u>308(96,0)</u>	<u>294(4,7)</u>	<u>310(7,2)</u>	<u>310(36,5)</u>	<u>326(14,1)</u>
<u>M-2H-18</u>		--	<u>306(17,9)</u>				
<u>M-33</u>	--	--	<u>293(77,9)</u>	<u>279(12,4)</u>	<u>295(6,0)</u>	<u>295(14,1)</u>	<u>311(5,3)</u>
<u>u</u>	--	<u>269(0,9)</u>	--	--	--	--	<u>287(2,4)</u>
<u>b</u>	<u>244(5,3)</u>						
<u>q</u>	<u>232(5,0)</u>	<u>242(17,6)</u>	<u>242(63,5)</u>	<u>244(5,7)</u>	<u>244(6,2)</u>	<u>244(12,2)</u>	<u>244(31,1)</u>
<u>q-H</u>	<u>231(15,5)</u>	<u>241(11,2)</u>	<u>241(31,0)</u>	<u>243(13,3)</u>	<u>243(33,7)</u>	<u>243(17,5)</u>	<u>243(100)</u>
<u>M-2H/q</u>		<u>240(2,3)</u>	<u>240(100)</u>				
<u>M-2H/q-H</u>		<u>239(4,5)</u>	<u>239(10,1)</u>				
<u>q-H<sup>b</sup></u>	<u>217(62,3)</u>	<u>227(33,9)</u>	<u>227(83,3)</u>	<u>229(13,5)</u>	<u>229(25,2)</u>	<u>229(58,3)</u>	<u>229(24,8)</u>
<u>M-2H/q-H<sup>b</sup></u>		<u>225(12,6)</u>	<u>225(37,4)</u>				
<u>q+H</u>	<u>205(6,7)</u>						
<u>q-15</u>	<u>203(21,3)</u>	<u>213(7,3)</u>	<u>213(19,2)</u>	<u>215(5,5)</u>	<u>215(4,2)</u>	<u>215(10,2)</u>	<u>215(9,3)</u>
<u>f-H</u>	<u>189(9,3)</u>	<u>189(12,1)</u>	--	<u>189(11,5)<sup>c</sup></u>	<u>205(2,7)</u>	<u>205(10,2)</u>	--
<u>f-H-18</u>			<u>187(21,6)<sup>c</sup></u>		<u>187(9,6)</u>		<u>203(17,0)</u>
<u>m-H</u>	<u>177(5,7)</u>	<u>187(7,0)</u>	<u>187(21,6)<sup>c</sup></u>	<u>189(11,5)<sup>c</sup></u>	<u>189(5,6)</u>	<u>189(3,2)</u>	<u>189(11,7)<sup>c</sup></u>
<u>M-2H/m-H</u>		<u>185(11,3)</u>	<u>185(40,0)</u>				
<u>n-H</u>	<u>175(20,1)</u>	<u>175(13,1)</u>	--	<u>175(5,6)<sup>g</sup></u>	<u>191(0,9)</u>	--	--
<u>k-H</u>	<u>163(10,2)</u>	<u>173(14,1)</u>	<u>173(46,0)<sup>g</sup></u>	<u>175(5,6)<sup>g</sup></u>	<u>175(5,1)</u>	<u>175(10,9)</u>	<u>175(18,7)</u>
<u>n-H-18</u>			<u>173(46,0)<sup>g</sup></u>		<u>173(5,6)</u>		<u>189(11,7)<sup>c</sup></u>
<u>M-2H/k-H</u>		<u>171(11,4)</u>	<u>171(51,4)</u>				
<u>i-H</u>	<u>149(43,2)<sup>c</sup></u>	<u>159(24,6)</u>	<u>159(78,3)</u>	<u>161(7,2)</u>	<u>161(8,4)</u>	<u>161(16,3)</u>	<u>161(13,5)</u>
<u>M-2H/i-H</u>		<u>157(19,3)</u>	<u>157(75,5)</u>				
<u>j-H</u>	<u>149(43,2)<sup>c</sup></u>	<u>149(6,6)</u>	--	<u>149(34,0)</u>	--	--	--
<u>l-H</u>	<u>135(44,3)</u>	<u>135(16,4)</u>	--	<u>135(13,1)</u>	<u>151(1,5)</u>	<u>151(2,4)</u>	<u>167(4,1)</u>
<u>j-H-18</u>			<u>147(36,2)</u>		<u>147(11,2)</u>		<u>163(17,5)</u>
<u>l-H-18</u>			<u>133(53,0)<sup>c</sup></u>		<u>133(13,7)</u>		<u>149(27,3)</u>
<u>g-H</u>	<u>123(24,6)</u>	<u>133(30,0)</u>	<u>133(53,0)<sup>c</sup></u>	<u>135(13,1)</u>	<u>135(9,8)</u>	<u>135(15,7)</u>	<u>135(30,4)<sup>g</sup></u>
<u>M-2H/g-H</u>		<u>131(19,3)</u>	<u>131(40,6)</u>				
<u>p-H</u>	<u>121(33,1)</u>	<u>121(44,5)<sup>c</sup></u>	<u>137(6,7)</u>	<u>121(26,1)</u>	<u>137(3,2)</u>	<u>137(12,5)</u>	<u>153(5,0)</u>
<u>p+2H</u>	<u>112(3,9)</u>	<u>122(17,4)</u>	<u>122(33,3)</u>	<u>124(17,0)</u>	<u>124(26,9)</u>	<u>124(52,8)</u>	<u>124(50,2)</u>
<u>p+H</u>	<u>111(17,7)</u>	<u>121(44,5)<sup>c</sup></u>	<u>121(64,4)</u>	<u>123(17,1)</u>	<u>123(27,4)</u>	<u>123(32,9)</u>	<u>123(46,0)</u>
<u>M-2H/p+2H</u>		<u>120(78,4)</u>	<u>120(52,1)</u>				
<u>M-2H/p+H</u>		<u>119(46,5)<sup>g</sup></u>	<u>119(34,6)<sup>g</sup></u>				
<u>q-H</u>	<u>109(55,0)</u>	<u>119(46,5)<sup>g</sup></u>	<u>119(34,6)<sup>g</sup></u>	<u>121(26,1)</u>	<u>121(27,5)</u>	<u>121(42,3)</u>	<u>121(49,9)</u>
<u>n-H-18</u>			<u>119(34,6)<sup>g</sup></u>		<u>119(21,4)</u>		<u>135(30,1)<sup>g</sup></u>
<u>c-H</u>	<u>95(54,3)</u>						
<u>p-H</u>	<u>81(43,6)</u>	<u>81(34,3)</u>	<u>97(16,1)</u>	<u>81(46,6)</u>	<u>97(35,3)</u>	<u>97(14,4)</u>	<u>113(7,5)</u>
<u>r+H</u>	<u>69(25,1)</u>	<u>69(15,3)</u>	<u>85(10,4)</u>	<u>69(70,4)</u>	<u>35(5,4)</u>	<u>35(5,3)</u>	<u>101(7,9)</u>
<u>a+H</u>	<u>55(20,3)</u>						
	<u>41(7,2)</u>	<u>41(13,5)</u>	<u>41(10,1)</u>	<u>41(61,3)</u>	<u>41(53,3)</u>	<u>41(33,3)</u>	<u>41(53,1)</u>

a) Valores de m/z y abundancia relativa (entre paréntesis). Estructuras en figura 47, pág 131.

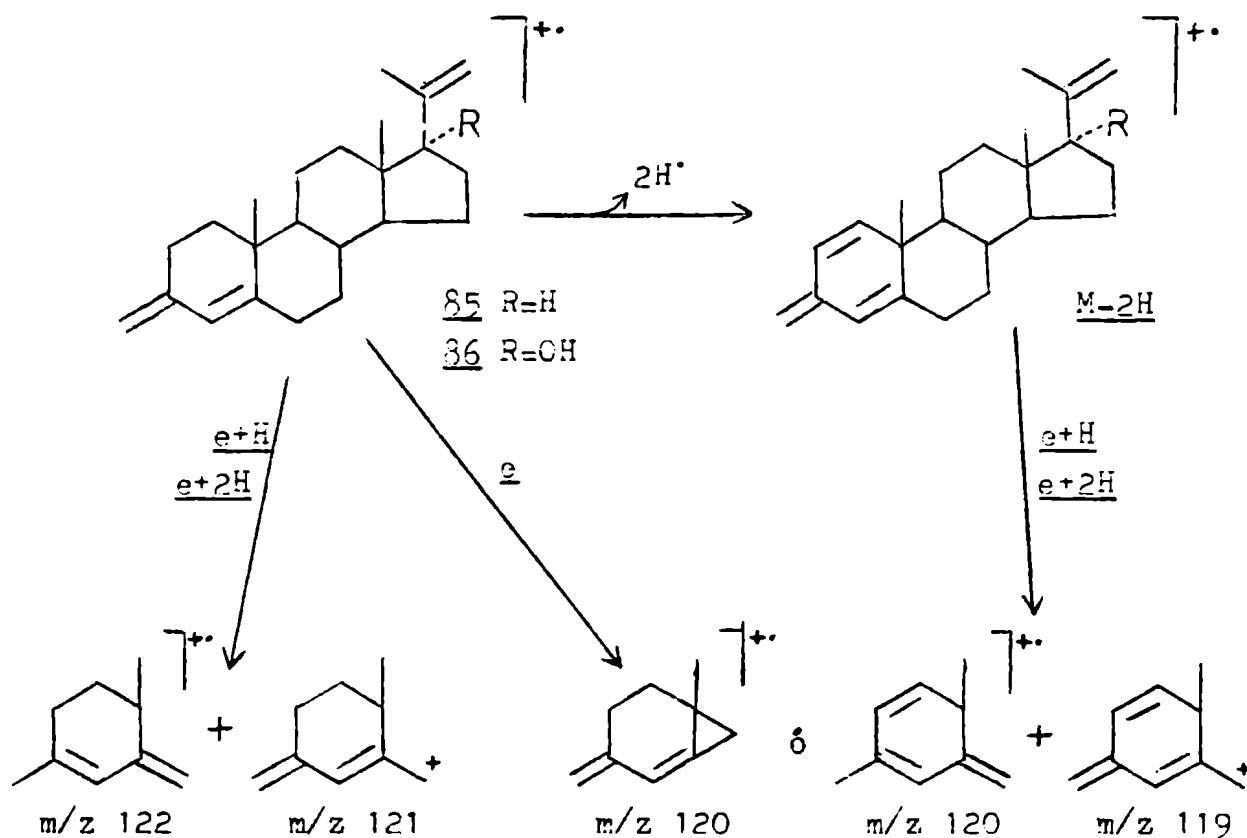
b) Junto con q-H, q, q-2H y q-H

c) Coinciden.

otra serie de rupturas, desplazadas en este caso en dos u.m., en los fragmentos que retienen el anillo A (rupturas e, g, i, k, m, o y q). Posiblemente los hidrógenos eliminados correspondieran a los de posiciones 1 y 2 dando lugar a un sistema  $\Delta^{1,4}$ -3-metileno, similar al  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto discutido anteriormente. De producirse dicha similitud la nueva sustitución del anillo A favorecería la fragmentación e con migración de dos átomos de hidrógeno hacia el grupo cargado. El resultado neto de estos dos procesos produciría la fragmentación e sin migración neta de átomos de hidrógeno (los dos hidrógenos que pierde originalmente los recupera durante la fragmentación). Esta sería una explicación alternativa a la propuesta por Zaretskii <sup>114</sup> para el fragmento observado (figura 52, pág. 139).

En el espectro de masa de 3,20-dimetilen-pregn-4-eno (85) se observaron señales a  $m/z$  122, 121, 120 y 119. Las dos primeras pueden explicarse mediante la ruptura e con migración de uno y dos hidrógenos hacia el fragmento cargado, en forma similar a lo descrito para los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides <sup>66</sup>. Los otros dos fragmentos provendrían de la ruptura e del ión M-2H (con ganancia de uno y dos hidrógenos) en forma similar a los  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoanálogos <sup>66</sup> o por ruptura directa del ión molecular sin migración de hidrógenos <sup>114</sup>. (figura 59).

A semejanza de pregna-1,4-dien-3,20-diona (9) el ión principal de la región  $m/z$  119-122 del espectro de 85 fue el ión  $m/z$  120, el cual provendría de la fragmentación e de M-2H con migración de dos átomos de hidrógeno (equivalente a  $m/z$  122 en 9). En cambio en la misma región del espectro del 17 $\alpha$ -hidroxiderivado del dimetilenesteroide (compuesto 36) el fragmento principal fue el  $m/z$  119,



**Figura 59:** Origen propuesto para los iones  $m/z$  119-122 en 3,20-dimetilen-pregn-4-eno (85) y su 17 $\alpha$ -hidroxiderivado (86).

concordantemente con lo que sucedió con el ión  $m/z$  121 en el caso de 17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (11). Este hecho apoyaría el origen y naturaleza propuesta para los fragmentos  $m/z$  119 y 120 (ruptura  $e+H$  y  $e+2H$  del ión  $M-2H$  respectivamente).

El espectro de 86 avaló la explicación propuesta en el caso de los  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroides para el aumento en la importancia de la ruptura  $e+H$  respecto de  $e+2H$  en los 17 $\alpha$ -hidroxiderivados (aumento de la ruptura  $\alpha-H$ , ver figura 58, pág. 170) ya que en el mismo también apareció notablemente favorecida la ruptura  $\alpha-H$ .

En cuanto a la ruptura e en los dimetilenesteroides 85 y 86 sin pérdida previa de dos átomos de hidrógeno (iones  $m/z$  121 y 122), esta se produjo en ambos casos preferentemente con la migración de un solo átomo de hidrógeno hacia el ión. En cambio en el caso de las 20-metil-pregna-4,20-dien-3-onas (95, 97, 98 y 99) apareció en mayor proporción el fragmento correspondiente a la migración de dos átomos de hidrógeno (e+2H), ya descrito para el sistema  $\Delta^4$ -3-ceto <sup>66</sup>, observándose también el fragmento correspondiente a la migración de un solo átomo de hidrógeno desde y hacia el fragmento cargado (e-H y e+H respectivamente). En el caso de la pérdida de un átomo de hidrógeno, éste no puede asignarse a la pérdida previa de dos átomos y recuperación posterior de uno (ruptura e+H de M-2H), como en el caso de los 3-metilen análogos, ya que no se observó el ión M-2H en estos esteroides. Además, de producirse la pérdida previa de dos átomos de hidrógeno, se formaría un sistema  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto el cual se fragmentaría preferencialmente con captación de dos átomos de hidrógeno, al menos en los 17-desoxiderivados, que en este caso daría lugar a un ión sin migración neta de hidrógeno ( $m/z$  122).

En el caso de 20-metil-pregn-20-eno (88) el ión principal resultante de la ruptura e se produjo con la pérdida concomitante de un átomo de hidrógeno (e-H).

La ruptura f-H característica de  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides, se encontró presente en todos los esteroides, salvo en los compuestos 17 $\alpha$ -hidroxilados, en cuyo caso se observó el fragmento desplazado 18 u.m. debido a la deshidratación de los mismos.

El anillo B de todos los esteroides de esta serie sufrió



también las rupturas g y h, mientras que en el anillo C se produjeron las fragmentaciones indicadas como i, j, k, l, m y n (h-18, i-18, l-18 y n-18 en los 17 $\alpha$ -hidroxiesteroides).

En cambio las rupturas a, b (anillo A), c y d (anillo B) solo se observaron en 20-metilenpregnano (88) ya que en los otros casos implicarían la desconexión de dobles enlaces ó uniones vinílicas. En cuanto a las complejas rupturas del anillo A mencionadas para el sistema  $\Delta^4$ -3-ceto (pérdida de cetena y de propilo) <sup>66</sup>, resultó algo incierta su presencia en los casos de 20-metil-pregna-4, 20-dien-3-ona (95) y sus monohidroxiderivados en posiciones 17 $\alpha$  (97) y 21 (98), donde apareció un pico a M-85 de intensidad mayor al 13 %, ya que en esos casos coincidiría con otras fragmentaciones (o en 95 y q en 97 y 98), mientras que en el caso del dihidroxiderivado (99) el fragmento resultó considerablemente menos importante (4,5 %).

Los fragmentos provenientes de la ruptura del anillo D estarían favorecidos dado que ellos se originan en la desconexión inicial de la unión C13-C17, alílica respecto del doble enlace, y por lo tanto, activada por éste. Sin embargo no se observaron las rupturas s y t. En cambio resultaron notablemente importantes el resto de las fragmentaciones del anillo.

Los fragmentos resultantes de la desconexiones o y q (el primero de ellos dando lugar a las cinco señales características) se destacaron nítidas en los espectros analizados. En el caso de los dimetilenesteroides 85 y 86 se encontraron acompañados por señales desplazadas 2 u.m., correspondientes a las rupturas o y q de M-2H. En estos dos esteroides se observó el gran incremento producido por el hidroxilo-17 $\alpha$  en las fragmentaciones del anillo D, ya

que dicho sustituyente labilizaría aún más la unión C13-C17 ( $\alpha$  al hidroxilo), transformando en pico base al fragmento resultante de la ruptura  $\alpha$  de M-2H en 86.

El mismo efecto se observó en el fragmento  $\alpha$  en los  $\Delta^4$ -3-ceto-20-metilenesteroides, llegando al punto de transformar este fragmento en pico base en el caso del  $17\alpha,21$ -dihidroxiderivado (99). Un posible mecanismo que explique la importancia de la ruptura  $\alpha$  sería el presentado en la figura 60.

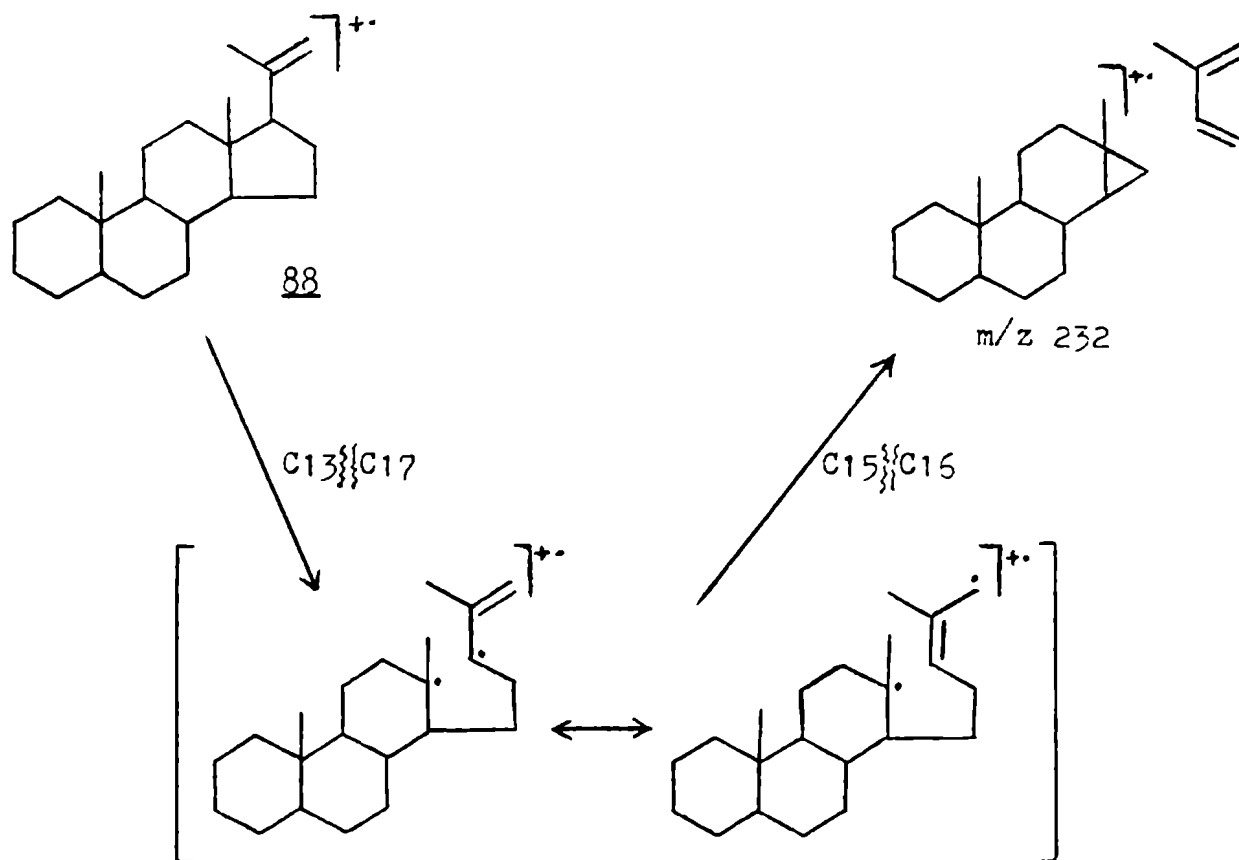


Figura 60: Mecanismo propuesto para la fragmentación  $\alpha$  en los 20-metilenesteroides (ejemplificado para 88).

La ruptura g se ve impulsada además por la estabilidad del fragmento neutro resultante (dieno conjugado).

La pérdida de un metilo del fragmento g dio lugar a una ión nitidamente observable en los espectros, como sucede en los otros grupos de esteroides analizados.

Finalmente se observaron también las rupturas p y r que dan lugar a fragmentos de bajo peso molecular aunque perfectamente distinguibles en la región correspondiente del espectro. La confirmación del origen de estos picos provino de comparar los espectros de los desoxiesteroides, con aquellos mono y dihidroxilados en posiciones  $17\alpha$  y/o 21, donde las señales se desplazan 16 y 32 u.m.

La pérdida de la cadena lateral (con la carga sobre la misma o en el esqueleto esteroideal)(rupturas u y v), favorecida en el caso de los 20-cetoesteroides, no lo es así en los 20-metilenderivados dado que implicaría la ruptura de la unión vinílica C17-C20. El fragmento  $m/z$  41 no puede considerarse como originado en la ruptura v dado que en los 21-hidroxiesteroides 98 y 99 apareció con igual intensidad a pesar de que si el fragmento proviniese de dicha ruptura, debería aparecer a  $m/z$  57. En cambio su contrapartida, el fragmento u, indicó claramente la poca importancia de la ruptura de la cadena lateral. Por la misma razón no se produjo la pérdida del grupo  $\text{CH}_2\text{OH}$  (M-31) en el caso del 21-hidroxiderivado (98), partición característica de esta funcionalización en los 20-cetopregnanos (ver compuestos 12 y 14 en la tabla III-2, pág. 154).

### III.2. Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ (RMN- $^1\text{H}$ ).

#### GENERALIDADES:

Las únicas señales discernibles en el espectro RMN- $^1\text{H}$  a 100 MHz de los distintos pregnanos analizados (figuras 46, 47 y 48, pág. 130-132), son las correspondientes a los metilos 18, 19 y 21, los hidrógenos olefínicos, los unidos a carbonos hidroxilados, el de posición 17 y, en algunos casos, el hidrógeno unido a oxígeno.

Respecto de los metilos angulares 18 y 19 del esteroide, Zürcher <sup>88</sup>, estudiando más de 200 esteroides, determinó que es posible calcular la frecuencia a que absorben dichos metilos, por simple aditividad de los efectos de los sustituyentes presentes (efectos tabulados en el mismo trabajo).

En el caso de los hidrógenos olefínicos también se encuentran tablas empíricas para el cálculo de los mismos, en función de la sustitución del doble enlace <sup>123</sup>. Para ello se fija un valor base de 5,25 ppm para el hidrógeno olefínico y se agregan los efectos de sustituyentes según su naturaleza y ubicación en el alqueno (geminal, cis ó trans respecto del hidrógeno calculado).

#### RESULTADOS Y DISCUSION:

Los espectros RMN- $^1\text{H}$  de los esteroides de las distintas series disponibles se analizan en forma conjunta. Las señales significativas de dichos espectros se resumen en las tablas III-8, 9 y 10.

Tabla III-3: Señales más importantes en los espectros RMN-<sup>1</sup>H de pregnan-20-onas saturadas, mono y diinsaturadas <sup>a</sup>.

	<u>84</u>	<u>102</u>	<u>106</u>	<u>107</u>	<u>108</u>	<u>109</u>	<u>110</u>	<u>111</u>	<u>24</u>	<u>114</u>
H-1								5,35 dd		
H-2			5,71 ba <sup>b</sup>					J=10; 2 Hz		
H-3		5,60 da	5,71 ba <sup>b</sup>			5,56 da	5,62 ba <sup>b</sup>	5,65 m		
		J=10 Hz				J=10 Hz				
H-4	5,91 ba	5,95 da	5,54 ba		5,30 ba	5,28 da				
		J=10 Hz				J=10 Hz				
H-6	5,35 ba	5,40 ba		5,26 ba						
H-17	2,54 t	2,56 t	2,54 t	2,54 t	2,52 t	2,53 t	2,53 t	2,53 t	2,53 t	2,54 t
	J=8 Hz	J=8 Hz	J=8 Hz	J=9 Hz	J=8 Hz	J=9 Hz	J=9 Hz	J=8 Hz	J=9 Hz	J=9 Hz
H-18	0,65 s	0,66 s	0,65 s	0,64 s	0,65 s	0,63 s	0,62 s	0,62 s	0,61 s	0,60 s
H-19	0,91 s	0,96 s	0,94 s	1,00 s	1,03 s	0,78 s	0,76 s	0,96 s	0,78 s	0,92 s
H-21	2,13 s	2,14 s	2,13 s	2,14 s	2,13 s	2,12 s	2,12 s	2,12 s	2,12 s	2,12 s
ArCH <sub>2</sub> S	3,96 s									
Ar <sup>c</sup>	7,30 ba									

a) Ver estructuras correspondientes en figura 48, pág. 132.

b) Coinciden.

c) C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>.

Tabla III-9: Señales más importantes en los espectros RMN-<sup>1</sup>H de pregn-4-en-3,20-dionas (1-8) y pregna-1,4-dien-3,20-dionas (9-16) <sup>a</sup>.

	H-1	H-2	H-4	H-11	H-17	H-15	H-19	H-21	H-21
1			5,76 ba		2,53 t J=2 Hz	0,68 s	1,27 s	2,14 s	HC-21
2			5,69 ba	4,42 ba	2,52 t J=5 Hz	0,92 s	1,40 s	2,14 s	
3			5,75 ba			0,76 s	1,20 s	2,25 s	
4			5,75 ba			0,71 s	1,20 s	4,21 d J=5 Hz	3,25 t J=5 Hz
5			5,69 ba	4,46 m		1,02 s	1,44 s	2,20 s	
6			5,70 ba	4,44 ba	b	0,94 s	1,48 s	4,22 d J=5 Hz	3,25 t J=5 Hz
7			5,74 ba			0,71 s	1,19 s	H <sub>A</sub> 4,28 dd H <sub>B</sub> 4,68 dd J=20; 5 Hz	3,07 t J=5 Hz
8			5,69 ba	4,44 ba		0,94 s	1,44 s	H <sub>A</sub> 4,30 dd H <sub>B</sub> 4,70 da J=20; 5 Hz	3,05 t J=5 Hz
9	7,05 d J=10 Hz	6,23 dd J=10; 2 Hz	6,08 ba		2,52 t J=8 Hz	0,71 s	1,25 s	2,13 s	
10	7,26 d J=10 Hz	6,27 dd J=10; 2 Hz	6,01 ba	4,43 ba	2,52 t J=5 Hz	0,94 s	1,46 s	2,11 s	
11	7,04 d J=10 Hz	6,23 dd J=10; 2 Hz	6,08 ba			0,78 s	1,23 s	2,27 s	
12	7,03 d J=10 Hz	6,23 dd J=10; 2 Hz	6,07 ba			0,73 s	1,23 s	4,19 d J=5 Hz	3,23 t J=5 Hz
13	7,26 d J=10 Hz	6,26 dd J=10; 2 Hz	6,02 ba	4,50 ba		1,04 s	1,46 s	2,29 s	
14	7,26 d J=10 Hz	6,27 dd J=10; 2 Hz	6,02 ba	4,44 ba		0,95 s	1,47 s	4,20 d J=5 Hz	3,24 t J=5 Hz
15	7,04 d J=10 Hz	6,23 dd J=10; 2 Hz	6,07 ba			0,74 s	1,27 s	H <sub>A</sub> 4,30 dd H <sub>B</sub> 4,70 dd J=20; 5 Hz	3,03 t J=5 Hz
16	7,25 d J=10 Hz	6,23 dd J=10; 2 Hz	6,02 ba	4,44 ba		0,96 s	1,46 s	H <sub>A</sub> 4,28 dd H <sub>B</sub> 4,68 dd J=20; 5 Hz	3,02 t J=5 Hz

a) Ver estructuras correspondientes en figura 46, pág. 130.

b) Se transforma en un cuarteto (J=2 Hz) por agregado de D<sub>2</sub>O.

Tabla III-10: Señales más importantes en los espectros RMN-<sup>1</sup>H de 3- y/o 20-metilen-esteroides <sup>a</sup>.

	<u>85</u>	<u>86</u>	<u>87</u>	<u>88</u>	<u>92</u>	<u>95</u>	<u>97</u>	<u>98</u>	<u>99</u>
3=CH <sub>2</sub> H <sub>A</sub>	4,62 ba	4,64 ba	4,64 ba						
H <sub>B</sub>	4,70 ba <sup>b</sup>	4,69 ba	4,70 ba						
H-4	5,82 ba	5,84 ba	5,84 ba		5,93 ba	5,74 ba	5,75 ba	5,74 ba	5,74 ba
H-6					5,3 ba				
H-18	0,62 s	0,69 s	0,74 s	0,58 s	0,62 s	0,63 s	0,69 s	0,64 s	0,62 s
H-19	1,08 s	1,07 s	1,06 s	0,78 s	0,92 s	1,19 s	1,19 s	1,19 s	1,19 s
20-CH <sub>2</sub> R <sup>c</sup>	1,80 sa	1,85 sa		1,76 sa	1,77 sa	1,76 sa	1,84 da	4,07 ba	H <sub>A</sub> 4,18 d
						J=1 Hz		H <sub>B</sub> 4,40 d	
H-21 H <sub>A</sub>	4,70 ba <sup>b</sup>	5,01 ba	2,27 s <sup>d</sup>	4,70 ba	4,73 ba	4,72 ba	5,00 m	4,96 ba	J=12 Hz
H <sub>B</sub>	4,86 ba	4,94 ba		4,84 ba	4,87 ba	4,83 ba	4,94 dm	5,23 da	5,20 ba
Ar-CH <sub>2</sub> -S							J=1 Hz	J=1 Hz	5,24 ba
Ar <sup>e</sup>					3,96 s				
					7,30 ba				

a) Ver estructuras correspondientes en figura 47, pág. 131. b) Coinciden. c) R=H, OH.

d) Metilo, genéticamente relacionado con el grupo 20-CH<sub>3</sub>. e) C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>.

### III.2.1. Hidrógeno-17 $\alpha$ :

Esta señal apareció como un triplete ancho de  $J=8-9$  Hz por acoplamiento con los hidrógenos de C16. La posición de esta señal (2,52-2,54 ppm) no se afectó por la presencia de insaturaciones sobre el anillo A y C6, por la presencia de los sistemas 4-en-3-ceto y 1,4-dien-3-ceto, ni por la configuración del C5 en los esteroides saturados, como era de esperarse debido a la distancia que se para el hidrógeno observado de las modificaciones estructurales mencionadas. Tampoco se afectó por la 11 $\beta$ -hidroxilación.

Evidentemente, la hidroxilación en posición 17 $\alpha$ , produjo la desaparición de esta señal, mientras que en el caso de los 20-metilenesteroides no se diferenció del resto de los hidrógenos alifáticos debido a la desaparición de la desprotección del carbonilo 20, causante de su diferenciación en los 20-cetopregnanos.

Finalmente, la hidroxilación en posición 21 aumentó la complejidad de la **región donde aparece** la señal del H17 $\alpha$  en el resto de los esteroides, haciendo imposible su asignación inequívoca.

### III.2.2. Metilos 18, 19 y 21:

La desprotección que ejerce el carbonilo sobre los hidrógenos de los carbonos vecinos, que hizo que la señal del hidrógeno 17 se resolviera del resto, es la responsable del corrimiento hacia campos bajos del metilo 21, el cual apareció a  $\delta$  2,12-2,29 ppm, a diferencia de los metilos 18 y 19 cuyas señales aparecieron a campos más altos (0,60-1,46 ppm). La ubicación de esta señal coincidió



con los datos encontrados en literatura <sup>124</sup> para el metilo 21 en 20-cetopregnanos.

No se observaron variaciones significativas en la posición de la señal correspondiente al metilo 21 debido a la presencia de los distintos sustituyentes en los anillos A y B ensayados ni por el cambio de configuración de C5. Tampoco se afectó el  $\delta$  de la señal del metilo 21 por hidroxilación en posición 11 debido a la distancia que separa el grupo observado de las modificaciones mencionadas.

En cambio la hidroxilación en posición 17 $\alpha$  produjo un notable desplazamiento de la señal del metilo 21 hacia campos más bajos, siendo algo más importante en el caso de los 20-cetoesteroides (aproximadamente 0,15 ppm) que en los 20-metilenanálogos (aproximadamente 0,07 ppm).

Finalmente, la transformación de un 20-cetoesteroide en su 20-metilenanálogo produjo una considerable protección de los hidrógenos del metilo 21, de aproximadamente 0,40 ppm. Además se produjo el ensanchamiento de la señal, llegando en algunos casos a observarse un doblete ( $J=1$  Hz) debido al acoplamiento alílico con uno de los hidrógenos metilénicos.

La tabla descripta por Zürcher <sup>88</sup>, para el cálculo del  $\delta$  de metilos angulares 13 y 19 por adición del efecto de distintos sustituyentes a los esqueletos base de 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -androstano (compuestos 128 y 129), presenta el efecto de las insaturaciones en posiciones 1, 2, 4 y 5, de un dieno en posiciones 3,5 y de los sistemas 4-en-3-ceto y 1,4-dien-3-ceto. También presenta el efecto de la ca

dena lateral de los 20-cetopregnanos, sola ó acompañada por los hidroxilos  $17\alpha$  y/o 21. Finalmente aparece el efecto de un hidroxilo  $11\beta$  sobre el  $\delta$  de los metilos 18 y 19.

Calculados los  $\delta$  de los metilos 18 y 19 analizados para los cuales estaban tabulados los efectos de los sustituyentes presentes se observó una notable concordancia entre los valores calculados y los observados ( $\pm 0,02$  ppm). La única discrepancia correspondió a pregn-1-en-20-ona (111). El valor indicado para el efecto de un doble enlace 1,2 es de 0,050 ppm<sup>88</sup>, el cual fue calculado en base a un solo esteroide, no detallándose lamentablemente en el trabajo de que compuesto se trataba. Sin embargo en todos los otros casos donde se encuentra un doble enlace en posición  $\beta$  al metilo, el efecto sobre dicho metilo indicado es notablemente mayor. Avalan esta afirmación el efecto indicado para las insaturaciones  $\Delta^{3,5}$  (0,200 ppm),  $\Delta^4$  (0,250 ppm),  $\Delta^5$  (0,230 ppm),  $\Delta^{5,7}$  (0,142 ppm),  $\Delta^8$  (0,125 ppm) y  $\Delta^{9(11)}$  (0,142 ppm) sobre el metilo 19, y  $\Delta^{8(14)}$  (0,175 ppm) y  $\Delta^{14}$  (0,250 ppm) sobre el metilo 18.

La diferencia entre el  $\delta$  observado del metilo 19 en el  $\Delta^1$ -esteroide (111) y en  $5\alpha$ -pregnan-20-ona (24) fue de 0,18 ppm, valor que correspondería al efecto de dicha insaturación sobre el metilo 19, el cual resulta más coherente con los efectos de las otras insaturaciones (el promedio de dichos efectos es de 0,189 ppm distribuyéndose entre 0,250 y 0,125 ppm).

Resultó imposible justificar esta discrepancia ya que se desconoce, como ya se indicara, en base a que estructura se calculó el valor indicado para el efecto del doble enlace 1,2.

Es posible calcular también, en base a los datos experi-

mentales, el efecto de una insaturación en posición 3,4 y de un dieno en 2,3,4,5 los cuales no fueron determinados en el trabajo anterior. Para ello simplemente se calculó la diferencia entre el  $\delta$  de los metilos 18 y 19 en el  $\Delta^3$ -esteroide (109) (ó en el  $\Delta^{2,4}$ -derivado (106) según de cual se trate) y en  $5\alpha$ -pregnan-20-ona (24), como se hiciera en el caso del efecto de la insaturación 1,2.

De este modo se obtuvieron valores de 0 y 0,02 ppm para el efecto de la insaturación 3,4 sobre los metilos 19 y 18 respectivamente, lo cual está de acuerdo con la poca influencia descripta<sup>88</sup> del doble enlace 2,3 sobre dichos  $\delta$ .

En cambio los valores calculados en el caso del 2,4-dieno fueron de 0,16 y 0,04 ppm respectivamente. En el primer caso, nuevamente se trata de una insaturación en posición  $\beta$  al metilo y, por lo tanto, era de esperarse una desprotección de ese orden. En el segundo caso, el pequeño efecto observado fue similar al producido por las insaturaciones  $\Delta^4$ ,  $\Delta^5$  y  $\Delta^{3,5}$ , probablemente debida a una pequeña distorsión conformacional del esqueleto esteroideal. Este pequeño efecto sobre el metilo 18 fue menor en el caso de los  $\Delta^1$ ,  $\Delta^2$  y  $\Delta^3$ -derivados, ya que estas insaturaciones solo involucran átomos del anillo A y, por lo tanto, la distorsión del esqueleto (sobre todo en el otro extremo del esteroide) es menor.

La transformación del grupo 3-ceto en un 3-metileno produjo un significativo corrimiento de la señal del metilo 19 hacia campos altos (-0,11/-0,14 ppm), no afectando la señal del metilo 18 (-0,02/0 ppm).

A la inversa, la transformación del carbonilo-20 en el 20-metil- $\Delta^{20}$ -derivado correspondiente, no afectó el  $\delta$  en RMN- $^1\text{H}$  del

metilo 19 ( $\pm 0,01$  ppm), modificando sensiblemente la señal del metilo 18 hacia campos altos ( $-0,05/-0,09$  ppm).

### III.2.3. Hidrógenos sobre carbonos hidroxilados:

La hidroxilación en posición 21 produjo el esperado efecto sobre los hidrógenos remanentes en dicho extremo de la molécula, llevando la señal correspondiente a valores de  $\delta$  superiores a las 4 ppm (4,05-4,80 ppm).

En el caso de los 20-cetoesteroides analizados, la señal de los hidrógenos 21 apareció, en ausencia de otro hidroxilo en posición 17 $\alpha$ , a  $\delta$  4,20 ppm como un doblete de  $J=5$  Hz. Dicho doblete se transformó en una señal única por agregado de  $D_2O$ , lo cual indicó que el acoplamiento observado se producía entre los hidrógenos del metileno con el hidrógeno hidroxílico. Confirmó esto la desaparición de un triplete ( $J=5$  Hz), presente a  $\delta$  3,25 ppm, con el agregado de  $D_2O$ , lo cual indicó que el mismo se trataba de la señal correspondiente al hidrógeno del hidroxilo, acoplado con los dos hidrógenos metilénicos. No se observaron diferencias entre los dos hidrógenos unidos al C21.

La presencia de un hidroxilo en posición 17 $\alpha$  modificó drásticamente la señal de los hidrógenos del grupo  $CH_2OH-21$  ya que en este caso se produjo la diferenciación entre los mismos, apareciendo como dos cuartetos, centrados a  $\delta$  4,30 y 4,70 ppm aproximadamente, producto del acoplamiento geminal entre sí ( $J=20$  Hz) y del acoplamiento con el hidrógeno hidroxílico ( $J=5$  Hz) (sistema ABX). Las señales se simplificaron a dos dobletes ( $J=20$  Hz) por el agre

gado de  $D_2O$ , desapareciendo además el triplete correspondiente al hidrógeno unido al oxígeno hidroxílico. Cabe destacar que esta última señal también se vio afectada por la presencia del hidroxilo  $17\alpha$  ya que en este caso apareció a campos más altos ( $\delta$  3,07 ppm).

En el caso de los 20-metilenesteroides, el  $CH_2OH-21$  apareció a campos algo más altos ( $-0,12/-0,30$  ppm)(Tabla III-10, pág. 182). En ausencia del hidroxilo  $17\alpha$  nuevamente los hidrógenos sobre C21 no se diferenciaron dando lugar a una banda ancha, ya que no se observó el acoplamiento con el hidrógeno hidroxílico. Este hecho podría deberse a que en el caso de los 20-cetopregnanos, el hidrógeno hidroxílico se encontraría formando un puente de hidrógeno con el carbonilo, por lo cual sería más dificultoso su intercambio, produciéndose el acoplamiento. En cambio en los 20-metilendevivados la mayor facilidad de intercambio del hidrógeno hidroxílico impide su acoplamiento con los hidrógenos de C21. La formación de puentes de hidrógeno entre el hidroxilo-21 y el carbonilo-20 se discutirá nuevamente en III.5. (pág. 244).

La presencia del hidroxilo  $17\alpha$  produjo nuevamente el desdoblamiento de la señal del  $CH_2OH-21$  en los 20-metilenesteroides, dando lugar a dos dobletes anchos ( $J=12$  Hz).

La hidroxilación en C11 dio lugar a una señal ancha a  $\delta$  4,45 ppm aproximadamente, correspondiente al  $H11\alpha$ . Dicho hidrógeno no se encuentra acoplado simultáneamente con  $H9$ ,  $H12\alpha$ ,  $H12\beta$  y el hidrógeno hidroxílico, transformándose en un cuarteto por agregado de  $D_2O$ . Dicha multiplicidad se debe a que el  $H11\alpha$  forma ángulos diedros iguales con los tres hidrógenos, siendo las tres constantes de

acoplamiento iguales ( $J_{11\alpha-12\alpha} = J_{11\alpha-12\beta} = J_{11\alpha-9} = 2 \text{ Hz}$ ) (figura 61) el cual, de acuerdo a la ecuación de Karplus <sup>125</sup>, corresponde a un ángulo diedro de  $59^\circ$  (de acuerdo con el valor teórico de  $60^\circ$ ).

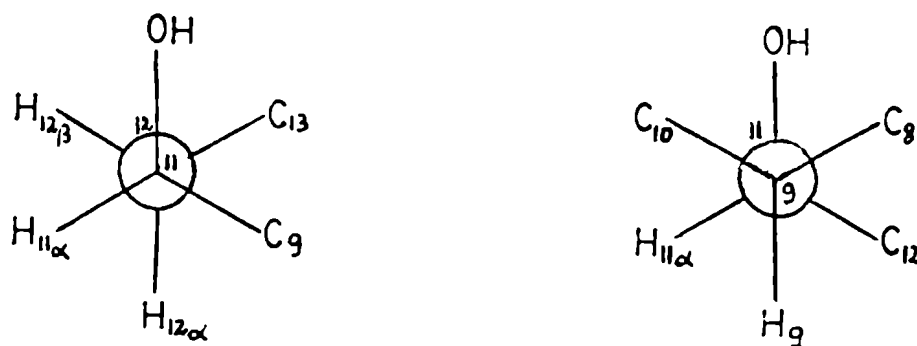


Figura 61: Proyecciones de Fisher según las uniones C9-C11 y C11-C12 de un  $11\beta$ -hidroxiesteroide.

#### III.2.4. Hidrógenos olefínicos:

Se calculó el  $\delta$  de los hidrógenos olefínicos <sup>123</sup> en los 20-cetopregnanos mono y diinsaturados, lográndose una muy buena predicción, salvo en el caso del  $\Delta^{2,4}$ -esteroide 106. Los valores calculados para el mismo hicieron totalmente ambigua la asignación de las señales. Según la misma existirían dos señales a  $\delta$  5,7 ppm y una a  $\delta$  6,0 ppm. En cambio el espectro presentó dos señales a  $\delta$  5,7 ppm pero la tercera apareció a campos más altos ( $\delta$  5,5 ppm).

Una aproximación distinta (aunque más cercana estructuralmente) resulta de partir del esqueleto del ciclohexadieno (144) <sup>123</sup>.

Para "transformar" dicha estructura en el esteroide requerido es necesario solo (en lo que respecta al sistema olefínico) agregar un sustituyente alifático sobre el C4 de 144 (correspondiente al C5 del esteroide). Dicho sustituyente no afectaría el  $\delta$  de H1 y H2 del ciclohexadieno, mientras que produciría un efecto cis sobre el H3 de -0,25 ppm (figura 62). De este modo los  $\delta$  calculados para los hidrógenos 1, 2 y 3 del 4-alkil-ciclohexadieno, serían respectivamente de 5,8; 5,9 y 5,65 ppm (correspondientes a los hidrógenos 2, 3 y 4 del esteroide).

En este caso se observan dos señales a campos más bajos (H2 y H3) y otra a campos levemente más altos, apoyando así la asignación tentativa propuesta en la figura 62 y en la tabla III-8 (pág. 180).

Se encuentra informado en literatura <sup>19</sup> el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 20-metil-pregna-2,20-dieno (145), indicándose un valor

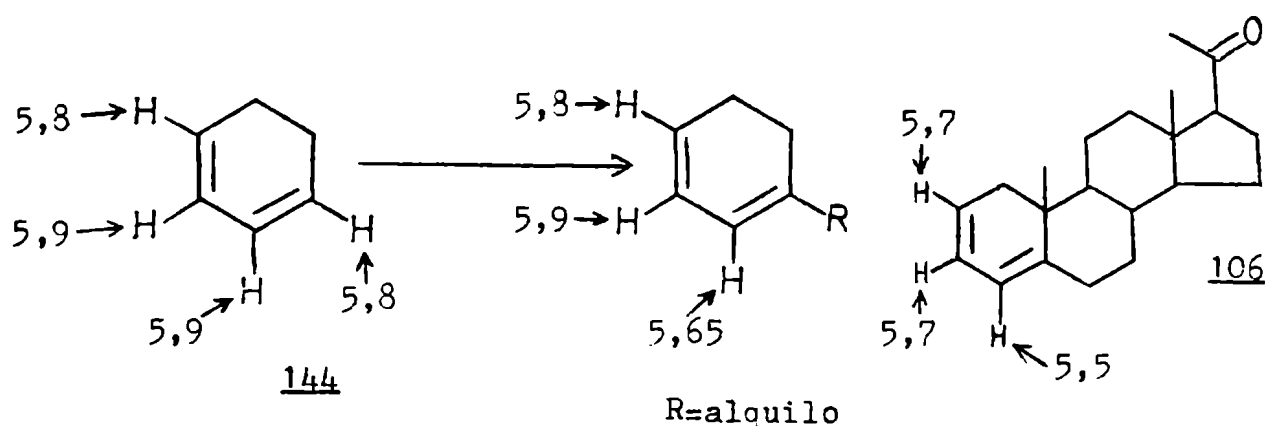
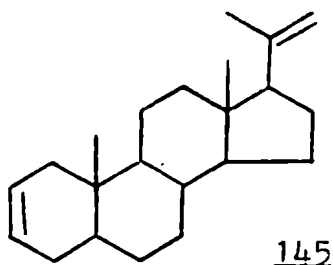


Figura 62: Predicción del  $\delta$  de los hidrógenos olefínicos de pregna-2,4-dien-20-ona (106).



de 5,56 ppm para el  $\delta$  de H2 y H3, en concordancia con el valor obtenido en el caso de pregn-2-en-20-ona (110). En cambio, en el caso del  $\Delta^5$ -esteroide se indica <sup>126</sup> en literatura un valor de  $\delta$  5,6 ppm para el H6, el cual difiere del valor observado en pregn-5-en-20-ona (107). Esto podría explicarse en el hecho que los valores indicados fueron determinados en  $3\beta$ -hidroxiesteroides, grupo que sería el causante del corrimiento de la señal. La señal del H6 absorbe a campos más altos ( $\delta$  5,38 ppm) en los  $3\alpha$ -hidroxiderivados y más aún ( $\delta$  5,18 ppm) cuando este último se encuentra acetilado <sup>127</sup>.

La introducción en el 3,5-dien-esteroide de un grupo bencílico en posición 3, produjo la desaparición, como era de esperarse, de la señal del H3, mientras que las correspondientes a los otros hidrógenos olefínicos (H4, H6) prácticamente no se modificaron (-0,04/-0,05 ppm). Tampoco se observaron mayores diferencias en el  $\delta$  de los metilos 18, 19 y 21, ni del H17. En cambio aparecieron dos señales correspondientes al grupo funcional introducido: el metileno bencílico no acoplado ( $\delta$  3,96 ppm) y los hidrógenos aromáticos



del bencilo (banda ancha a  $\delta$  7,30 ppm).

Los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides presentaron, en la región olefínica del espectro, una señal ancha correspondiente al H<sub>4</sub>. El ensanchamiento de la misma se debe a acoplamientos a larga distancia con los hidrógenos de posición 2 (a través del carbonilo 3) y 6 (a través del doble enlace).

El reemplazo del carbonilo 3 por el grupo 3-metileno provocó una pequeña desprotección del H<sub>4</sub> (+0,09 ppm), mientras que la introducción de un doble enlace 1,2 desplazó la señal de dicho hidrógeno hacia campos bajos en forma considerablemente mayor (+0,33 ppm). Tanto la introducción de un doble enlace 1,2 como el reemplazo de los oxígenos 3 ó 20 por un metileno, produjeron además la aparición de nuevas señales en la región olefínica, correspondientes a los hidrógenos del doble enlace 1,2 ó de los 3 ó 20-metilenos.

Los hidrógenos 1 y 2 en los 1,4-dien-3-cetoesteroides se acoplaron entre sí ( $J=10$  Hz) apareciendo el primero como un doblete, mientras que el segundo correspondió a un doblete debido al acoplamiento a larga distancia con el H<sub>4</sub>, a través del carbonilo.

La señal del H<sub>1</sub> apareció a campos considerablemente menores ( $\delta$  7,0-7,3 ppm) que la de los otros dos hidrógenos olefínicos (H<sub>2</sub> 6,2-6,3 ppm; H<sub>4</sub> 6,0-6,1 ppm). Esto puede explicarse teniendo en cuenta que el efecto del carbonilo es similar sobre los hidrógenos del doble enlace en relación espacial geminal ó trans (1,06 y 0,95 ppm respectivamente) <sup>123</sup>, mientras que un sustituyente alquílico actúa en forma muy distinta según dicha relación espacial sea geminal (0,71 ppm), cis ó trans (-0,33 y -0,30 ppm respectivamente).

Por lo tanto el H1 se vería desprotegido por el grupo alquílico correspondiente al C10 en 0,7 ppm, mientras que dicho alquilo protegería el H2 en -0,30 ppm. En cuanto al H4 este sufriría la protección de los alquilos de C6 y C10 (cis y trans respectivamente), siendo este último hidrógeno el que apareció a campos más altos.

Las señales de los hidrógenos 1 y 2 en los  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto-esteroides y la del H4 tanto en los  $\Delta^4$ -3-ceto como en los  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoderivados, no se vieron afectadas por la hidroxilación en posiciones 17 $\alpha$  y/o 21, lo cual resulta lógico considerando la distancia que separa los hidrógenos observados de las modificaciones mencionadas. Del mismo modo la última señal en los 4-en-3-cetoesteroides, tampoco se vio afectada por el reemplazo del oxígeno-20 por un grupo metileno.

En cambio la hidroxilación en posición 11 $\beta$  produjo una pequeña protección sobre H4 (-0,06 ppm) en ambas funcionalizaciones del anillo A y sobre el H2 (-0,04 ppm) en los 1,4-dien-3-ceto derivados. El H1 en los últimos esteroides sufrió una desprotección por el hidroxilo-11 $\beta$  (+0,22 ppm). Estos corrimientos se deberían a la distorsión del esqueleto esteroideal, ocasionada por el hidroxilo, ya que este se encontraría suficientemente alejado como para descartarse una acción directa.

En la región olefínica de 20-metil-pregn-20-eno (88) aparecieron dos señales anchas a  $\delta$  4,70 y 4,84 ppm, correspondientes al grupo metileno unido a C20. El ensanchamiento de dichas señales se debe a los acoplamientos pequeños de los hidrógenos olefínicos entre si y a larga distancia con los hidrógenos de posiciones alí-

licas 17 y 21.

A valores de  $\delta$  muy similares absorbieron los hidrógenos metilénicos de dicha posición en el caso del  $\Delta^4$ -3-cetoderivado del compuesto anterior (95) (4,72 y 4,88 ppm) y su benciltioenolderivado (92) (4,73 y 4,87 ppm). Estos valores están de acuerdo con lo informado para el grupo 20-metileno <sup>19</sup> en 88 ( $\delta$  4,65 y 4,80 ppm).

El análisis del efecto de los hidroxilos 17 $\alpha$  y 21 sobre las señales anteriores no resultó simple, debido a la dificultad de correlacionar las señales que se modifican, es decir por ejemplo con cual de las dos señales del 17 $\alpha$ -derivado 97 en la región correspondiente del espectro, debe compararse la señal a  $\delta$  4,72 ppm correspondiente a 95 y cual con la señal a  $\delta$  4,88 ppm.

Importante información al respecto se obtuvo comparando 17 $\alpha$ -hidroxi-20-hidroximetil-pregna-4,20-dien-3-ona (99) y su 17-desoxiderivado 98, observándose por lo tanto el efecto del hidroxilo 17 $\alpha$ . En este caso, cualquiera sea la forma de comparar las señales se observa que una de ellas prácticamente no se modificó (+0,01 ó -0,03 ppm) mientras que la otra se vio afectada en forma notable (+0,24 ppm ó +0,28 ppm).

En base a ello se pasó a comparar 17 $\alpha$ -hidroxi-20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (97) y su 17-desoxiderivado 95. La única forma de que una de las señales prácticamente no cambie es considerando que aquella que apareció a  $\delta$  4,88 ppm en 95 se trasladara a  $\delta$  4,94 ppm en 97, mientras que el hidrógeno que apareció a  $\delta$  4,72 en 95 lo haría a  $\delta$  5,00 ppm en el caso de 97 (corrimientos de 0,06 y 0,28 ppm respectivamente).

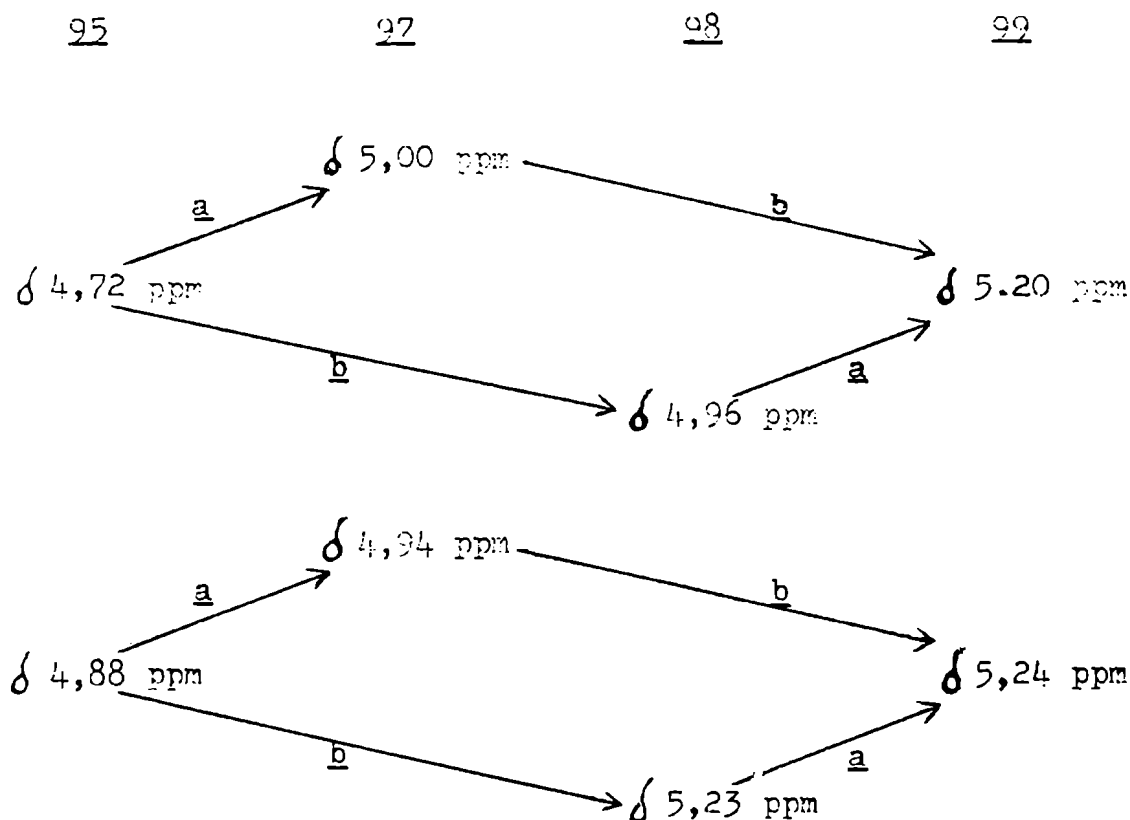
Comparando luego el 17 $\alpha$ ,21-dihidroxiesteroide (99) con el

21-hidroxilado (98) es posible analizar el efecto del hidroxilo 21. En este caso, cualquiera sea la forma de comparar las señales, la hidroxilación afecta considerablemente ambas señales (0,20/0,24 ó 0,30/0,26 ppm). En base a esto se analizaron finalmente 95 y su 21-hidroxiderivado 98, donde resulta que la señal a  $\delta$  4,72 ppm se trasladaría a  $\delta$  4,96 ppm mientras que la de  $\delta$  4,88 ppm pasaría a 5,23 ppm. La asignación inversa implicaría un fuerte efecto sobre un solo hidrógeno (0,51 ppm) mientras que el otro prácticamente no se modificaría (0,08 ppm). Estos resultados se compatibilizan mejor con la segunda opción propuesta en el caso del par 97/99 (0,30/0,26 ppm).

Como conclusión de este análisis es posible afirmar que la hidroxilación en posición 17 $\alpha$  afectó en forma significativa (0,28 ppm) la señal a  $\delta$  4,72 ppm en 95, mientras que la otra señal no se vio modificada mayormente (0,06 ppm). En cambio el hidroxilo-21 afectó ambas señales, aunque en mayor medida (0,35 ppm frente a 0,24 ppm) la señal a  $\delta$  4,88 ppm. La correlación de las señales se esquematiza en la figura 63.

No es posible determinar cual de las señales es la que corresponde al hidrógeno que se encuentra en configuración cis respecto del esqueleto esteroideal, ya que no está determinado si el hidrógeno cis ó el trans es el más afectado por la hidroxilación alílica.

Avalan la asignación secuencial presentada el hecho que las señales que aparecieron a  $\delta$  4,94 y 5,23 ppm en 92 y 98 respectivamente se encontraron acopladas con los hidrógenos de C21. Esto indicó además que el hidrógeno más afectado por la hidroxilación en



**Figura 63:** Correlación de las señales correspondientes a los hidrógenos olefínicos de la cadena lateral en 20-metil-pregna-4,20-diona (95) y sus derivados 17 $\alpha$  y/o 21 hidroxilados (97, 98 y 99) (a: 17- ; b: 21-hidroxilación).

C21 es el que se encontraba acoplado con los hidrógenos de dicha posición.

En el espectro de 3,20-dimetilen-pregn-4-eno (85) aparecieron tres señales en la región de  $\delta$  4,5-5,0 ppm, la central de las cuales integró para dos hidrógenos. Comparando este espectro con los de 20-metil-pregn-20-eno (88) es posible asignar la señal a  $\delta$  4,86 ppm y la mitad de la señal a  $\delta$  4,70 ppm al grupo insatura

do de la cadena lateral. La otra mitad de la señal a  $\delta$  4,70 ppm y la de  $\delta$  4,62 corresponderían entonces a la insaturación del anillo A. Esto fue confirmado por comparación con el espectro del 17 $\alpha$ -hidroxiderivado del compuesto anterior (86) en el cual aparecieron cuatro señales dado que no se produjo la superposición de las mismas. Las señales correspondientes al metileno-20 sufrieron la desprotección debida al hidroxilo-17 en forma similar a la observada en el caso de 97 respecto de 95. En cambio las señales del metileno-3 no se modificaron mayormente por la 17 $\alpha$ -hidroxilación debido a la distancia que separa al grupo en cuestión de la funcionalidad introducida.

Finalmente, en el caso de 3-benciltio-20-metil-pregna-3,5,20-trieno (92) aparecieron las señales correspondientes a la funcionalidad del anillo A (Tabla III-10, pág. 182) las cuales no se modificaron por la transformación del carbonilo-20 en el 20-metilenderivado correspondiente (comparar con el compuesto 84 de la tabla III-8, pág. 180).

### III.3. Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ (RMN- $^{13}\text{C}$ ).

#### GENERALIDADES:

Beierbeck y Saunders <sup>106,107</sup> presentaron una nueva interpretación para el efecto  $\beta$  en RMN- $^{13}\text{C}$ , en base a interacciones gauge entre hidrógenos, carbonos u otros sustituyentes en el carbono en cuestión y carbonos o sustituyentes en posición  $\beta$  (figura 64).

En sucesivos trabajos <sup>108,28</sup> los investigadores anteriores detallaron aún más estas interacciones. El efecto  $\beta(\text{HC})$  fue adjudicado a una interacción sin-1,3-diaxial entre el hidrógeno del

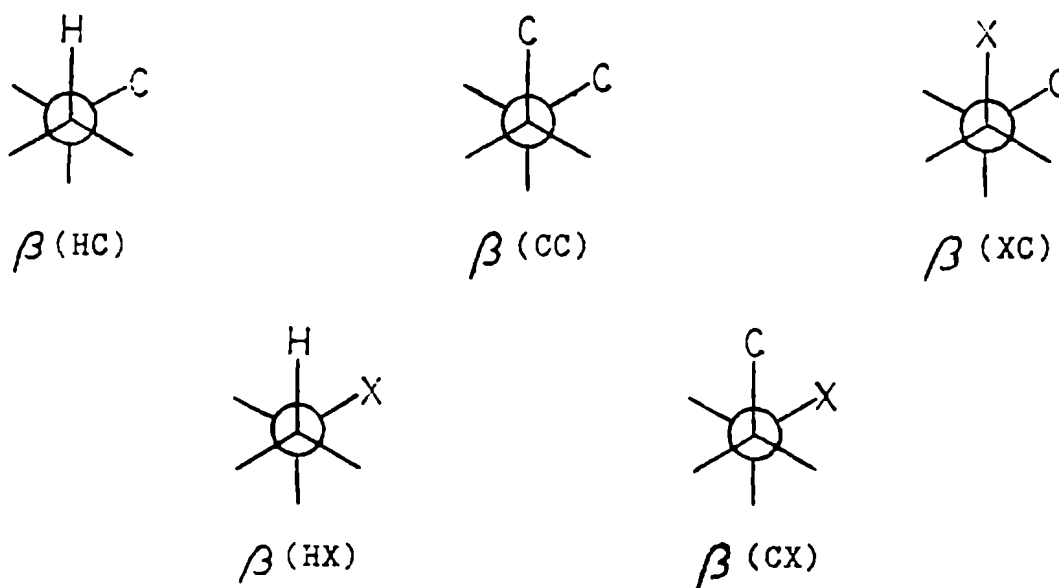


Figura 64: Efecto  $\beta$  en RMN- $^{13}\text{C}$  (referencias 106 y 107).

carbono observado y un hidrógeno sobre el carbono  $\beta$ , mientras que el efecto  $\delta$  (del mismo orden pero signo contrario) fue descartado como un efecto del sustituyente en sí, e interpretado como la eliminación de un efecto  $\beta$ , debido al reemplazo del hidrógeno del  $C\beta$ . Para sustituyentes distintos de C agregaron además una corrección por efecto inductivo.

Finalmente, Beierbeck y colaboradores <sup>28</sup>, determinaron los valores numéricos para efectos  $\beta$ ,  $\delta$  (efecto inductivo) y  $\delta$  en sistemas de anillos de 6 miembros en conformación silla. También calcularon para esos sistemas, los parámetros correspondientes a hidroxilos, aminas, carbonilos y olefinas. En base a dichos valores es posible predecir en forma semiempírica el desplazamiento químico de los carbonos de sistemas de ciclohexanos (por ejemplo los anillos A, B y C de esteroides).

En el caso particular de los esteroides, es posible encargar la predicción de dos maneras:

- Cálculo a partir de valores base para carbonos primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios según el caso, y adición de todos los efectos presentes.
- Cálculo a partir del esqueleto esteroideal básico, por adición de los efectos que aparecen por introducción de un sustituyente y sustracción de los efectos que desaparecen por la misma razón.

En base a los efectos determinados por Beierbeck y colaboradores <sup>28</sup>, se calcularon los desplazamientos químicos de todos



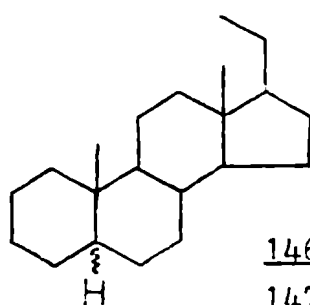
los carbonos de los anillos A, B y C, y metilos angulares en  $5\alpha$ - y  $5\beta$ -pregnan-20-ona (compuestos 24 y 114 respectivamente) y sus derivados mono y diinsaturados resumidos en la figura 48 (pág. 132), analizándose los resultados en III.3.1.

Por otro lado Eggert y Djerassi <sup>91</sup> sugirieron que para lograr predicciones de espectros de RMN-<sup>13</sup>C de esteroides insaturados polifuncionales, es necesario que estas se basen en valores experimentales de modelos que contengan el mismo esqueleto insaturado base. Para verificar esto se calcularon los efectos de los hidroxilos  $11\beta$ ,  $17\alpha$  y 21 sobre todos los carbonos esteroidales en pregn-4-en-3,20-dionas, pregna-1,4-dien-3,20-dionas y 20-metilen-pregna-4-en-3-onas de las cuales se disponía (figuras 46 y 47, pág. 130 y 131). Los resultados se discuten en III.3.2.

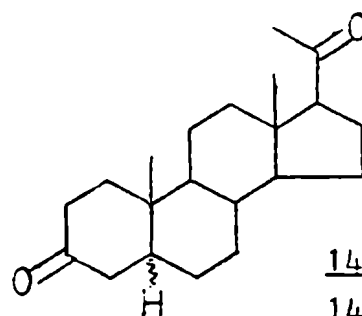
#### RESULTADOS Y DISCUSION:

Para el análisis comparativo de los espectros de RMN-<sup>13</sup>C de las distintas series de compuestos fue menester realizar previamente la asignación inequívoca de todas las señales de dichos espectros ya que un error en las mismas provocaría conclusiones erróneas al cabo de dicho análisis.

La asignación de  $5\alpha$ - y  $5\beta$ -pregnan-20-ona (24 y 114) se basó en los espectros de  $5\alpha$ - y  $5\beta$ -pregnano (146 y 147) respectivamente (para los carbonos de los anillos A y B) y de  $5\alpha$ - y  $5\beta$ -pregna-3,20-diona (148 y 149) respectivamente (para los carbonos de los anillos C y D), presentes en literatura <sup>105</sup>. Los espectros de los



146 5 $\alpha$ -H  
147 5 $\beta$ -H



148 5 $\alpha$ -H  
149 5 $\beta$ -H

20-cetopregnanos se resumen en la tabla III-11.

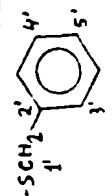
En base al espectro de 24, fue posible asignar con facilidad todos los carbonos del anillo D, cadena lateral y metilo 18 en los espectros de los 20-cetopregnanos mono y diinsaturados debido a que no se observaron variaciones en dichas señales por las distintas sustituciones analizadas.

Para el resto de las señales de los esteroides monoinsaturados, resultaron de gran utilidad los espectros de androstanos y colestanos monoinsaturados en distintas posiciones del anillo esteroidal, realizados por Eggert y Djerassi <sup>91</sup>.

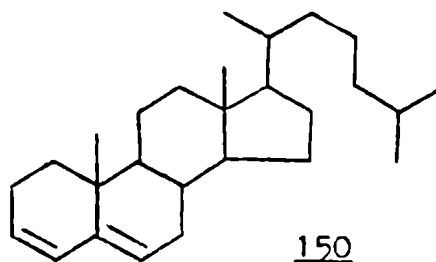
Las señales de los anillos A y B y de los carbonos 11, 12 y 19 de pregna-3,5-dien-20-ona (102) se asignaron por comparación con el espectro de colesta-3,5-dieno (150) <sup>105</sup>, salvo en el caso de los carbonos 3 y 4, cuyas asignaciones fueron intercambiadas según propusieron Beierbeck y colaboradores <sup>28</sup>. En este caso se observaron diferencias algo mayores que en las comparaciones de esteroides monoinsaturados, posiblemente debido a que el espectro

Tabla III-11: Señales de los espectros RMN- $^{13}\text{C}$  de pregnan-20-onas saturadas, mono y diinsaturadas <sup>a</sup>.

C	84	102	106	107	108	109	110	24	114	91	151	89
1	34,34	33,73	38,25	39,86	37,80	34,19	39,76	39,72	37,58	34,41	39,71	38,68
2	27,65	22,95	123,05 <sup>b</sup>	22,53	19,43	23,50	125,67 <sup>b</sup>	22,17	21,33	27,68	125,62 <sup>c</sup>	22,16
3	125,26	124,88	122,72 <sup>b</sup>	27,99	25,73	125,33	125,56 <sup>b</sup>	26,79	27,01 <sup>b</sup>	125,57	125,62 <sup>c</sup>	26,77
4	131,05	128,71	117,15	32,83	119,10	131,07	30,24	29,00 <sup>c</sup>	27,17 <sup>b</sup>	130,96	30,35	29,00 <sup>c</sup>
5	141,02	141,15	145,59	143,53	144,49	45,88	41,43	47,06	43,60	141,10	41,37	46,99
6	122,03	122,49	31,29 <sup>b</sup>	118,53	32,46	27,40	28,62	29,00 <sup>c</sup>	27,39 <sup>b</sup>	122,22	28,62	29,00 <sup>c</sup>
7	31,61	31,56	31,47 <sup>b,c</sup>	31,79 <sup>c</sup>	33,20	32,03	31,74	32,12	26,52	31,80 <sup>c</sup>	31,84	32,23
8	31,70	31,73	36,30	31,79 <sup>c</sup>	35,95	35,64	35,58	35,55	35,87	31,80 <sup>c</sup>	35,47	35,41
9	47,92	48,21	54,90	50,45	54,28	53,34	53,91	54,69	40,52	47,67	53,52	44,24
10	34,78	35,13	37,41	37,51	37,03	34,97	34,62	36,26	35,38	34,80	34,59	36,25
11	21,04	20,94	21,60	20,80	21,42	21,08	20,93	20,87	20,93	20,66	20,39	20,31
12	38,73	38,80	39,08	38,94	39,05	39,13	39,08	39,21	39,36	30,40	30,19	30,46
13	43,98	44,04	44,10	43,98	44,16	44,33	44,10	44,16	44,33	47,76	48,17	48,33
14	56,94	57,01	56,28	57,04	56,47	56,70	56,65	56,86	56,85	51,06	50,51	50,67
15	24,32	24,33	24,55	24,48	24,45	24,45	24,39	24,40	24,45	23,83	23,94	23,94
16	22,81	22,77	22,87	22,86	22,78	22,84	22,79	22,89	22,89	33,25	33,43	33,46
17	63,56	63,58	63,71	63,73	63,76	63,81	63,81	63,82	63,92	90,09	90,03	90,09
18	13,29	13,30	13,36	13,23	13,37	13,59	13,36	13,41	13,42	15,16	15,40	15,53
19	18,91	18,71	16,82	19,42	19,23	11,91	11,66	12,20	24,18	18,97	11,65	12,25
20	208,98	209,14	209,14	209,22	209,30	209,12	209,24	208,95	209,12	212,09	211,46	211,58
21	31,44	31,46	31,47 <sup>c</sup>	31,50	31,46	31,50	31,46	31,30	31,46	27,52	27,74	27,79
1' <sup>d</sup>	36,12									36,14		
2' <sup>d</sup>	137,29									137,36		
3' <sup>d</sup>	128,27									128,34		
4' <sup>d</sup>	128,59									128,66		
5' <sup>d</sup>	126,82									126,90		

a) Ver estructuras correspondientes en figura 48, pág. 132. d) 

b) Asignaciones intercambiables. c) Coinciden.



de 150 fue realizado en dimetilsulfóxido- $d_6$ , mientras que el de 102 se obtuvo en solución clorofórmica ( $CDCl_3$ ).

En cambio no se disponía de referencias acerca de espectros de RMN- $^{13}C$  de 2,4-dienesteroides. En este caso los esteroides de comparación fueron pregn-2-en-20-ona (110) y pregn-4-en-20-ona (108). Las señales de C8-C12 aparecieron a campos comparables con las de 108, mientras que la señal asignada al C1 fue la única en la región similar al carbono correspondiente en 110. La aparición de esta señal a campos algo más altos se debería a la presencia de la otra insaturación, ya que el C1 en 108 apareció a campos más altos que en el compuesto saturado. Por último, las dos señales restantes en la región alifática, fueron asignadas a los carbonos 6 y 7, no pudiendo diferenciárselas debido al inesperado corrimiento de las mismas respecto de 108 por introducción de una insaturación adicional en posición 2,3, conjugada con la anterior.

Respecto de los carbonos olefínicos se asignó la señal a  $\delta$  145,59 ppm al C5 por ser este cuaternario y, como tal, debería absorber en esa región de campos más bajos. Para la asignación de las otras tres señales se observó que en el caso del 3,5-dieneste

roide, las señales olefinicas del mismo aparecieron a  $\delta$  similares a las señales de los carbonos correspondientes en los 3-en y 5-enes teroides (109 y 107). Entonces, en base a los  $\delta$  de los carbonos olefinicos de 110 y 108, se propuso como asignación tentativa para los carbonos 2, 3 y 4 en preña-2,4-dien-20-ona (106) la presentada en la tabla III-11.

El espectro de 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) fue asignado totalmente en base al espectro de preña-3,5-dien-20-ona (102) anteriormente analizado, y de espectros de benciltioéteres descritos en literatura <sup>128</sup>.

Finalmente los espectros de los  $17\alpha$ -hidroxiderivados de  $5\alpha$ -pregnan-20-ona, pregn-2-en-20-ona y 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (compuestos 89, 151 y 91 respectivamente) fueron asignados en base a los correspondientes 17-desoxiesteroides (para los anillos A y B) y de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) (anillos C y D) <sup>129</sup>.

El espectro de progesterona (1) en  $\text{CDCl}_3$  se halla descrito en literatura <sup>105</sup>, así como los espectros de éste y sus derivados mono, di y trihidroxilados realizados en dimetilsulfóxido- $\text{d}_6$  <sup>67</sup>.

Respecto de los  $\Delta^1$ -derivados, solo se encuentra descrito el espectro de  $11\beta, 17\alpha, 21$ -trihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (16) en dimetilsulfóxido- $\text{d}_6$  <sup>130</sup>, mientras que de los 20-metilenes teroides no se hallaron referencias (en cuanto a sus espectros RMN- $^{13}\text{C}$ ).

La asignación del espectro de progesterona (1) (tabla III-12) fue confirmada empleando técnicas de irradiación selectiva fuera de resonancia (SFORD) y marcación con deuterio, resultando ple-

Tabla III-12: Señales de los espectros RMN-<sup>13</sup>C de pregn-4-en-3,20-dionas y pregn-1,1'-dien-3,20-dionas mono, di y trihidroxiladas <sup>a</sup>.

C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	35,66	35,04	35,69	35,75	34,97	34,98	35,67	34,78	155,36	155,65	155,34	155,10	156,02	155,54	155,31	157,35
2	33,87	33,81	33,90	33,92	33,74	33,77	33,88	33,70	127,39	127,80	127,43	127,50	127,68	127,89	127,45	127,28
3	199,03	199,00	199,11	198,89	199,10	198,94	199,13	200,38	185,99	186,19	186,01	185,86	186,37	186,16	186,05	187,10
4	123,75	122,27	123,78	123,91	122,20	122,28	123,83	121,92	123,74	122,35	123,78	123,86	122,25	122,41	123,84	121,93
5	170,58	171,61	170,65	170,22	171,76	171,31	170,50	173,43	168,63	169,49	168,54	168,23	169,92	169,30	168,48	171,40
6	32,71	32,04	32,79	32,70	32,05	31,92	32,74	32,15	32,71	31,49	32,79	32,69	32,00	31,89	32,70	32,14
7	31,85	32,63	32,04	31,93	32,68	32,53	32,02	32,81	33,45	33,80	33,53	33,46	33,95	33,77	33,57	34,16 <sup>b</sup>
8	35,50	31,35	35,47	35,59	31,29	31,34	35,67	31,50	35,43	31,14	35,40	35,48	31,13	31,16	35,48	31,33
9	53,57	56,43	53,28	53,60	55,96	56,26	53,29	55,96	52,15	55,65	51,81	52,09	55,23	55,54	51,70	55,50
10	38,51	39,22	38,53	38,56	39,19	39,14	38,55	39,32	43,40	43,98	43,43	43,36	44,04	43,89	43,39	44,48
11	20,98	68,15	20,51	20,97	68,37	67,91	20,58	67,87	22,80	70,00	22,31	22,68	70,25	69,79	22,31	69,79
12	38,61	48,22	30,06	38,42	39,75	47,89	30,14	39,64	38,45	48,08	30,01	38,21	39,70	47,80	29,99	39,52
13	43,83	42,93	48,10	44,64	47,54	43,67	48,55	47,47	43,98	43,04	48,27	44,76	47,78	43,89	48,75	47,75
14	55,94	57,49	49,94	56,10	51,41	57,42	50,29	51,85	55,52	56,71	49,55	55,60	50,77	56,76	49,83	51,31
15	24,32	24,33	23,91	24,49	23,93	24,39	23,72	23,77	24,49	24,54	24,06	24,64	24,19	24,65	23,88	24,03
16	22,80	22,72	23,51	22,99	33,37	22,44	34,54	33,90	22,80	22,68	33,53	22,90	33,29	22,42	34,51	33,83 <sup>b</sup>
17	63,40	63,79	89,70	59,06	89,41	59,37	88,93	88,66	63,27	63,62	89,58	58,90	89,36	59,29	88,74	83,72
18	13,31	15,87	15,38	13,45	18,00	15,96	15,02	17,34	13,40	15,78	15,46	13,52	17,94	15,87	15,09	17,26
19	17,33	21,00	17,41	17,41	21,01	20,95	17,39	20,89	18,65	21,06	18,72	18,67	21,08	21,04	18,68	20,94
20	208,84	208,54	211,13	209,77	211,18	209,53	211,95	212,14	208,78	208,50	211,02	209,61	211,30	209,55	211,94	212,01
21	31,41	31,17	27,78	69,30	27,83	69,07	67,33	66,94	31,36	31,14	27,78	69,25	27,93	69,07	67,37	66,96

a) Ver estructuras correspondientes en figura 46, pág. 130.

b) Asignaciones intercambiables.

c) en CDCl<sub>3</sub> + 5 % CD<sub>3</sub>OD

namente de acuerdo con lo informado por Blunt y Stothers <sup>105</sup>.

El espectro de 2,2,4,6,6,17,21,21,21-d<sub>9</sub>-pregn-4-en-20-ona (69) (figura 65) resultó de suma importancia para la asignación inequívoca de la señal correspondiente al C6, diferenciándola de la del C7 ya que la primera desapareció debido a la marcación, mientras que la segunda no se modificó. Cabe destacar que no es posible diferenciar estas señales por SFORD ya que ambos carbonos están unidos a dos átomos de hidrógeno, dando triplete en dichos espectros. En el espectro se observó también la desaparición de las señales de los carbonos 2, 17 y 21, mientras que disminuyó la intensidad de la señal del C4, debido en todos los casos al reemplazo en dichos carbonos de los hidrógenos por deuterios. Por otro lado desaparecieron también las señales de los carbonos cuaternarios C3, C5 y C20 debido a la marcación de su entorno. (se reemplazaron los hidrógenos vecinos con los cuales presentarían relajación dipolar cruzada).

La asignación del resto de las pregn-4-en-3,20-dionas (tabla III-12) se realizó principalmente en base a los espectros correspondientes realizados en dimetilsulfóxido-d<sub>6</sub> <sup>67</sup>, aunque, debido a las particulares características de este solvente (fuerte aceptor de puentes de hidrógeno), fue necesario verificar algunas asignaciones por SFORD y marcación específica con deuterio.

Los espectros de cortisol (8) y su  $\Delta^1$ -derivado (16) fueron realizados en CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD (95:5) debido a la baja solubilidad de los mismos en CDCl<sub>3</sub>.

De gran importancia resultó el espectro de 2,2,4,6,6-d<sub>5</sub>-cortisol (23) (figura 22, pág. 67) donde se observó la desaparición prácticamente total de las señales de los carbonos marcados. Esto

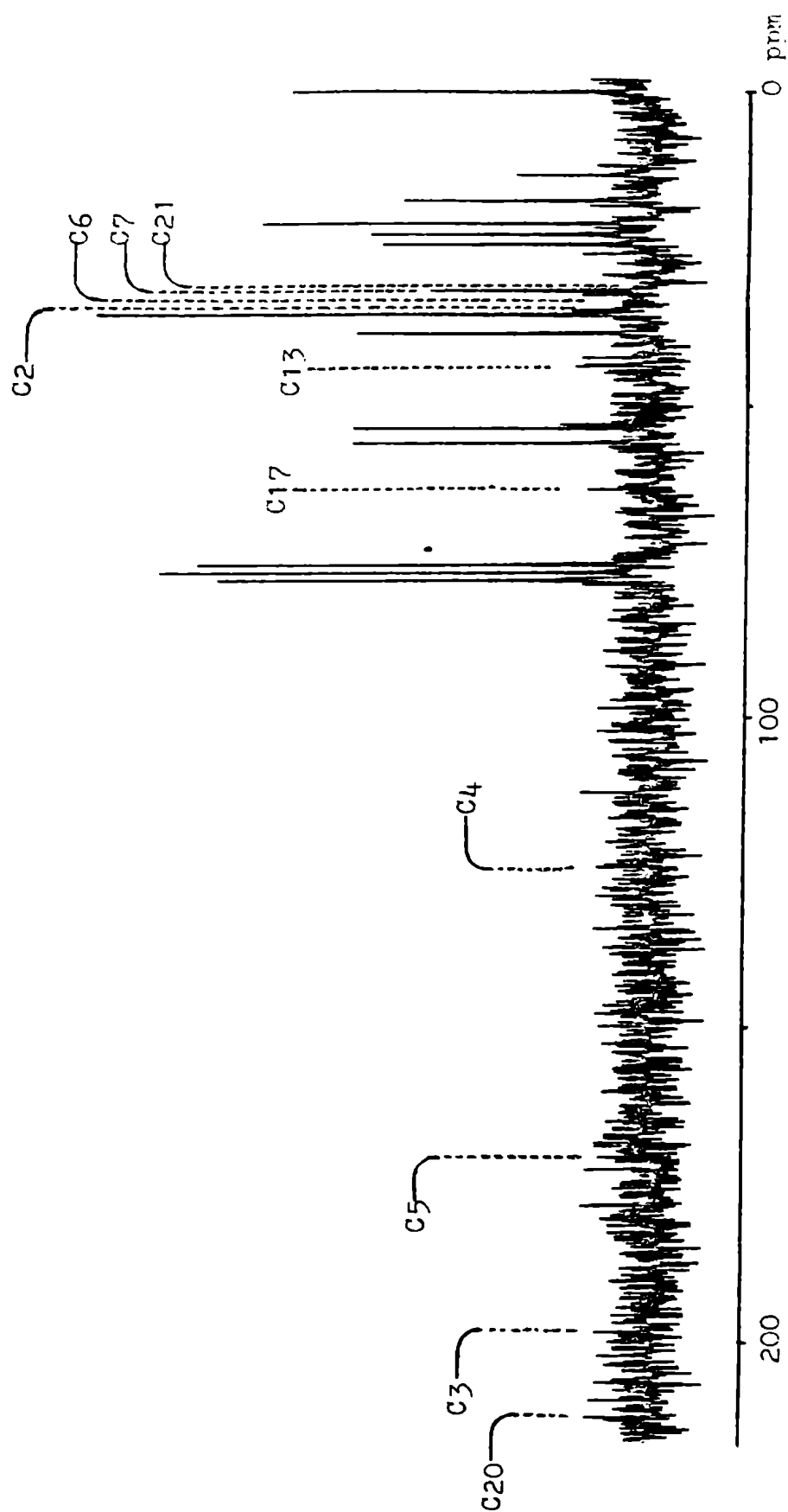


Figura 65: Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de  $\text{d}_9$ -progesterona (69) (se indican las señales afectadas y C7).



permitió determinar que señal correspondía al C6 (desapareció) y cual al C7 (no se vio afectada), las cuales se encontrarían invertidas respecto del espectro de 8 en dimetilsulfóxido- $d_6$ .

Teniendo en cuenta este hecho, se invirtieron las señales de C6 y C7 en todos los  $\Delta^4$ -3-ceto-esteroides  $11\beta$ -hidroxilados. En los 11-desoxiesteroides la asignación de C6 y C7 se hizo por similitud con los correspondientes carbonos en 1 (en este caso las señales no se invirtieron respecto de los espectros en dimetilsulfóxido- $d_6$ ).

La asignación de los  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroides (tabla III-12) se realizó por comparación con los  $\Delta^4$ -3-ceto esteroides correspondientes (en  $CDCl_3$ ), el espectro de  $\Delta^1$ -cortisol (16) en dimetilsulfóxido- $d_6$   $^{13}O$ , multiplicidad de las señales en los espectros SFORD y en espectros totalmente acoplados a  $^1H$  con efecto nuclear Overhauser y deuteración específica.

El espectro de 4,6,6,17,21,21- $d_7$ -pregna-1,4-dien-3,20-diona (20) (figura 66) fue necesario para la asignación de las señales correspondientes a C6 y C7, con lo cual pudo observarse que la señal de C6 no se modificó por introducción de un doble enlace 1,2. Esta asignación para el C6 en pregna-1,4-dien-3,20-diona (9) y por consiguiente en los otros 11-desoxiesteroides, fue confirmada con el espectro de 4,6,6,21,21,21- $d_6$ -17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (21).

La asignación de las 20-metilen-pregna-4-en-3-onas (tabla III-13) se realizó por comparación con los espectros de los 20-ceto esteroides correspondientes, por el método de ecos de spin con de-

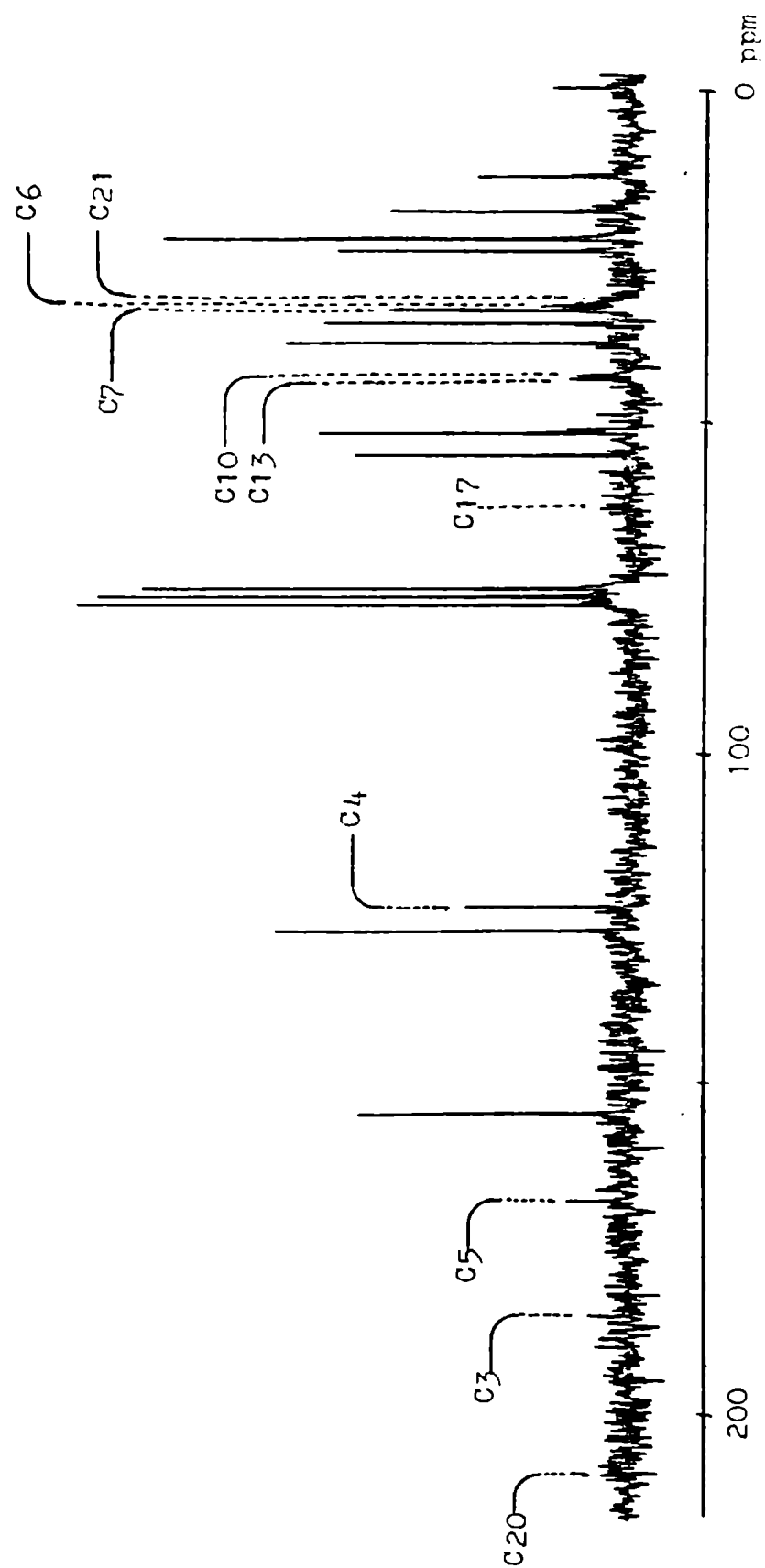


Figura 66: Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de  $\text{d}_7$ -pregna-1,4-dien-3,20-diona (70) (se indican las señales afectadas y la de C7).

Tabla III-13: Señales de los espectros RMN- $^{13}\text{C}$  de 20-metilen-esteroides <sup>a</sup>.

C	<u>38</u>	<u>35</u>	<u>36</u>	<u>92</u>	<u>95</u>	<u>97</u>	<u>98</u>	<u>99</u>
1	38,75	37,28	37,25	34,37	35,71	35,71	35,72	35,71
2	22,22	29,69	29,67	27,67	33,97	33,93	33,93	33,87
3	26,88	148,94	148,90	125,45	b	b	199,27	199,55
4	29,11 <sup>c</sup>	122,46	122,53	130,80	123,65	123,70	123,67	123,68
5	47,15	143,76	143,80	141,14	171,22	171,12	171,13	171,43
6	29,11 <sup>c</sup>	32,41 <sup>d</sup>	32,44 <sup>d</sup>	122,32	32,92	32,92	32,88	32,90
7	32,17	32,67 <sup>d</sup>	32,68 <sup>d</sup>	31,68	31,97	31,97	31,93	31,87
8	35,95	36,22	36,45	32,07	35,98	36,13	36,04	36,19
9	54,96	54,30	53,77	48,21	53,94	53,47	53,90	53,37
10	36,31	37,47	37,46	34,80	38,55	38,55	38,62	38,61
11	20,93	21,48	21,09	21,10	21,11	20,89	21,08	20,91
12	39,03	38,77	31,21	38,58	38,55	30,89	38,30	31,02
13	43,37	43,14	47,10	43,15	43,09	46,98	42,99	47,15
14	56,45	55,90	49,99	56,57	55,62	49,72	55,75	49,68
15	24,18	24,20	23,21	24,10	24,13	23,12	24,08	23,02
16	25,49	25,39	35,12	25,38	25,39	35,15	25,72	35,57
17	57,40	57,20	86,10	57,12	57,14	86,08	53,16	86,73
18	12,91	12,79	15,46	12,79	12,79	15,38	12,88	15,47
19	12,30	18,43	18,47	18,96	17,43	17,43	17,44	17,42
20	145,65	145,41	147,87	145,27	145,14	147,72	148,52	148,99
21	110,42	110,55	112,51	110,60	110,84	112,68	109,90	114,35
3=CH <sub>2</sub>		107,66	107,72					
20-CH <sub>2</sub> R <sup>e</sup>	24,61	24,60	21,27	24,61	24,54	21,07	66,76	66,15
1'				36,13 <sup>f</sup>				
2'				137,36 <sup>f</sup>				
3'				128,23 <sup>f</sup>				
4'				128,56 <sup>f</sup>				
5'				126,78 <sup>f</sup>				

a) Ver estructuras correspondientes en figura 47, pág. 131.

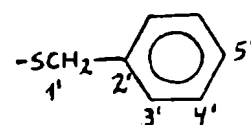
b) No se observaron.

c) Coinciden.

d) Asignaciones intercambiables.

e) R=H,OH.

f)



sacople alternado (conocido como APT) <sup>131</sup>, y comparación de los espectros entre si, teniendo en cuenta que señales se verían influenciadas por los diferentes esquemas de sustitución.

El espectro APT de 17 $\alpha$ -hidroxi-20-(hidroximetil)-pregna-4,20-dien-3-ona (99) permitió la asignación inequívoca de las señales de C1 y C8, en base a la cual se asignaron dichos carbonos en el resto de los esteroides del grupo.

La asignación de los espectros de 20-metil-pregn-20-eno (88) y su 3-benciltio-3,5-dienderivado (92) se realizó por comparación con los espectros de pregnan-20-ona (24) y 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) respectivamente, el espectro de 20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (95) y espectros APT.

El espectro APT de 92, trabajando en condiciones tales que solos se observen las señales de los carbonos cuaternarios ( $\gamma = 1/2J$ ), permitió la identificación de la señal correspondiente al C10, diferenciándola de la del C1. En las condiciones usuales de APT no es posible diferenciarlos ya que los carbonos que no están unidos a hidrógeno y aquellos que lo están a dos átomos de hidrógeno se comportan de igual forma. Este espectro permitió confirmar por comparación la asignación de las señales de C1 y C10 en 84.

El espectro APT en condiciones convencionales ( $\gamma = 1/J$ ) de 88, confirmó la asignación de las señales de C15, C16 y C21, a valando así también la asignación propuesta para el caso de 95.

Finalmente la asignación de los espectros de los dimetilenerosteroides 85 y 86 se realizó por comparación con los espectros de 95 y 92 respectivamente, los de pregn-4-en-20-ona (108) y pregn-5-en-20-ona (107) y espectros APT.

El espectro APT en las condiciones para la observación de carbonos cuaternarios, permitió diferenciar inequívocamente las señales correspondientes a C10 y C1.

### III.3.1. Pregnan-20-onas saturadas, mono y diinsaturadas:

Como puede verse en la tabla III-11 (pág. 202) las distintas insaturaciones analizadas no afectaron el desplazamiento químico de los carbonos que constituyen el anillo D, la cadena lateral y el metilo 18.

En cambio ya en el C12 se notó cierta influencia de la sustitución. En presencia de una insaturación 5,6 se produjo un pequeño corrimiento de esta señal hacia campos altos ( $\langle\delta\rangle = 38,82$  ppm para los  $\Delta^5$ -esteroides frente a  $\langle\delta\rangle = 39,15$  ppm para el resto). En el caso de los  $\Delta^4$ -esteroides, la señal afectada fue la de C11 con un corrimiento hacia campos bajos ( $\langle\delta\rangle = 21,51/20,93$  ppm para  $\Delta^4$ -derivados y esteroides 4,5 saturados, respectivamente). Estos pequeños corrimientos de las señales de C11 y C12 probablemente se deban a distorsiones conformacionales causadas por las insaturaciones mencionadas, las cuales se transmitirían a lo largo del esqueleto esteroideal.

El resto de los carbonos (anillos A y B, metilo 19) se afectaron, en mayor o menor medida, por las distintas insaturaciones.

Para la predicción del  $\delta$  de los carbonos de los anillos A, B y C de los mono y dienos se emplearon ambas estrategias mencionadas anteriormente (pág. 199), es decir a partir de valores base y a partir de los valores experimentales de 5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (24).

La tabla III-14 presenta las diferencias entre los valores calculados y los experimentales para los esteroides saturados, mono y diinsaturados.

El cálculo semiempírico, según la teoría propuesta por Beierbeck y colaboradores <sup>28</sup>, indicó que no debería haber diferencias en el  $\delta$  de C11, C12, C13, C14 y C18 del anillo C, para cualquiera de los esteroides analizados. Esto está de acuerdo con lo observado ya que solo sufrieron pequeños corrimientos C11 y C12 en presencia de insaturaciones en posiciones 4,5 y 5,6 respectivamente, adjudicados a pequeñas distorsiones del anillo.

Es de esperarse que distorsiones conformacionales afecten el  $\delta$  ya que las interacciones involucradas requieren de disposiciones espaciales perfectamente determinadas. Por ejemplo el efecto denominado  $\beta$ (HC) requiere la presencia de dos átomos de hidrógeno alineados en posición sin-1,3-diaxial. Si una distorsión conformacional afectara dicha alineación, la contribución al  $\delta$  de dicha interacción sería distinta.

Un ejemplo que muestra la drasticidad de este hecho es el cálculo del  $\delta$  de C8. El H8 se encuentra en posición gauche con cinco carbonos (C6, C10, C11, C13 y C15). Dos de ellos (C10 y C13) no poseen hidrógeno y por lo tanto no producen efecto  $\beta$ (HC). Los otros tres poseen hidrógenos y por lo tanto producirían un efecto  $\beta$ (HC) sobre C8 por interacción sin-1,3-diaxial entre dichos hidrógenos y H8. Sin embargo, si en el cálculo del  $\delta$  de C8 se considerarían tres interacciones  $\beta$ (HC), se obtendría un error de aproximadamente 4,5 ppm respecto del valor observado, equivalente a una interacción  $\beta$ (HC). Esto significa que se estaría considerando una inte

Tabla III-14: Diferencias entre los valores de  $\delta$  calculados y observados en los espectros RMN- $^{13}\text{C}$  de 20-cetopregnanos saturados, mono y diinsaturados <sup>a</sup>.

C	24	114	110		109		108		102		106		105	
	$\Delta A$	$\Delta A$	$\Delta A$	$\Delta B$	$\Delta A$	$\Delta B$	$\Delta A$	$\Delta B$	$\Delta A$	$\Delta B$	$\Delta A$	$\Delta B$	$\Delta A$	$\Delta B$
1	-1,0	-1,8	-2,8	-1,8	+0,3	+1,4	-3,3	-2,2	-1,5	-0,5	-4,5	-3,4	+1,5	+2,6
2	-	+0,9	+0,3	b	-2,0	-2,0	-0,4	-0,4	-0,3	-0,3	+2,9	b	-1,5	-1,5
3	-0,1	-0,3	+0,4	b	+0,7	b	+0,3	+0,4	-0,6	-0,5	+3,3	b	+1,1	b
4	+2,3	-0,5	+0,4	-1,9	-0,6	b	+3,0	b	-2,2	-4,5	+4,9	b	+1,8	b
5	-1,0	-0,2	+1,5	+2,5	-0,5	+0,5	-4,8	b	-3,8	b	-5,9	b	-3,4	b
6	+2,3	+1,2	+2,7	+0,4	+4,6	+2,3	-1,9	-4,2	+3,6	b	-0,7	-3,0	-0,4	b
7	-0,8	+0,2	-0,4	+0,4	-0,7	+0,1	-1,2	-0,4	-1,2	-0,4	+0,5	+1,3	-1,0	-0,2
8	-0,5	-0,8	-0,5	-	-0,5	-	-0,9	-0,4	+0,2	+0,6	-1,2	-0,7	+0,3	+0,7
9	-2,2	+2,9	-1,4	+0,8	-0,8	+1,4	-1,1	+1,1	-1,2	+1,0	-1,7	+0,5	+1,1	+3,4
10	+1,3	+2,2	+3,0	+1,7	+2,6	+1,3	-1,2	-2,5	-1,7	-3,0	-1,6	-2,9	-1,2	-2,5
11	+1,3	+1,4	+1,3	-	+1,1	-0,2	+0,8	-0,5	+1,4	+0,1	+0,6	-0,7	+1,3	-
12	-1,5	-1,7	-1,4	+0,1	-1,4	+0,1	-1,4	+0,1	-1,2	+0,3	-1,4	+0,1	-1,1	+0,4
13	-1,4	-1,5	-1,3	+0,1	-1,5	-0,1	-1,4	-	-1,2	+0,2	-1,3	+0,1	-1,2	+0,2
14	-4,4	-4,4	-4,2	+0,2	-4,2	+0,2	-4,0	+0,4	-4,5	-0,1	-3,8	+0,6	-4,5	-0,1
18	-1,4	-1,4	-1,4	-	-1,6	-0,2	-1,4	-	-1,2	+0,2	-1,4	-	-1,3	+0,1
19	-0,2	-3,1	+0,3	+0,5	+0,1	+0,3	-2,0	-1,8	-2,2	-2,0	+0,4	+0,6	-1,5	-1,3

$\Delta A$  Calculado a partir de valores base determinados en ciclohexanos.

$\Delta B$  Calculado a partir de los valores experimentales de 5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (24).

a) Ver estructuras correspondientes en la figura 48, pág. 132 y los valores experimentales en la tabla III-11, pág. 202.

b) No es posible calcular el  $\delta$  de los carbonos olefínicos por este método.

racción más que las realmente presentes. La misma corresponde a la H8-H15 $\beta$  ya que este último se encuentra en conformación cuasi axial y, por lo tanto, no alineado correctamente con el H8. El cálculo considerando solo dos interacciones  $\beta(\text{HC})$  predijo en forma adecuada los valores observados (corresponde a los valores utilizados en la confección de la tabla III-14).

En el caso de 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -pregnan-20-ona (24 y 114) los valores calculados difieren en  $\pm 3,1$  ppm de los observados, salvo el del C14 donde la desviación fue de  $-4,4$  ppm, aunque se consideren cinco interacciones  $\beta(\text{HC})$ , entre el H14 y los H7 $\alpha$ , H9, H12 $\alpha$ , H16 $\alpha$  y H17 $\alpha$ . Considerar las dos últimas interacciones no sería absolutamente correcto dado que los hidrógenos no se encuentran perfectamente alineados, condición fundamental tal como se indicó en el caso de C8. Por lo tanto la desviación sería aún mayor. Esta posiblemente se deba a que el C14 forma parte también del anillo D, de cinco miembros, mientras que los parámetros utilizados fueron calculados para ciclohexanos, valiendo estrictamente para ellos.

El cálculo del  $\delta$  de C15, por ejemplo, dio como resultado un valor de  $17,6$  ppm, el cual difiere en  $-6,8$  ppm del observado. Sin embargo el  $\delta$  calculado para el C13 (también involucrado en el anillo D) no difiere mayormente del valor observado ( $-1,5$  ppm).

En la predicción del  $\delta$  de la señal del C14 en los esteroides mono y diinsaturados se observaron errores del mismo orden cuando el cálculo se realizó en base al valor del metino. En cambio el error desapareció cuando el cálculo se realizó tomando como valor base el 5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (24).

En general los valores obtenidos en base a este último



esteroide se ajustaron mucho mejor a los  $\delta$  observados. Esto era de esperarse ya que al tomar 24 como base, se eliminan todos los errores debidos al cálculo del esqueleto esteroideal en si. Es así como desaparecieron practicamente los errores de C13 y C14 debido al apartamiento de la conformación silla teórica del anillo C, por la condensación con el anillo D, de cinco miembros.

Utilizando este último sistema de referencia, los valores calculados difirieron en  $\pm 3,4$  ppm de los observados, salvo en el caso del C6 del 4-en-esteroide, donde el error fue de 4,2 ppm, siendo el error menor a  $\pm 1$  ppm en el 66 % de los casos.

El único inconveniente de esta aproximación es que no es posible calcular los  $\delta$  de los carbonos olefínicos. En cambio utilizando como valor base ciclohexanos simples, la dispersión se extendió a  $\pm 4,9$  ppm, con un error para el  $\delta$  del C5 del 2,4-dieno más allá de ese rango (-5,9 ppm). Errores menores de  $\pm 1$  ppm se observaron solo en el 30 % de los casos.

Las mayores discrepancias se encontraron en el cálculo del  $\delta$  de los carbonos del anillo A de preña-2,4-dien-20-ona (106) (errores superiores a 3 ppm en cuatro de los seis carbonos del mismo). Esto probablemente se deba a la particularidad del sistema diénico homoanular, hecho que provocaría la distorsión total del anillo, afectando las interacciones espaciales involucradas en el  $\delta$ .

En cambio, en el caso de preña-3,5-dien-20-ona (102) (dieno heteroanular) la predicción de las señales de los anillos A y B involucrados en la sustitución, resultó ajustarse mucho mejor a los valores experimentales (mayor error + 1,8 ppm correspondiente al C4), lo cual está de acuerdo con la menor distorsión que provoca

ría esta disposición de la funcionalidad.

En cuanto a las interacciones  $\beta(\text{CC})$  sobre C5 Beierbeck y colaboradores<sup>28</sup> consideraron que existe una en el caso de colest-3,5-dieno. Los autores indicaron que se produce entre C6 y C19 los cuales formarían un ángulo diedro C6-C5-C10-C19 de 60°, ángulo para el cual se calculó un valor de interacción de 1,85 ppm. Sin embargo, el análisis de modelos moleculares indicó que los ángulos diedros C6-C5-C10-C19 y C4-C5-C10-C19 serían de aproximadamente 90°, para los cuales la interacción  $\beta(\text{CC})$  es nula. No se consideró esta interacción en el cálculo del  $\delta$  del C5 de 102, lográndose un mejor ajuste con los valores experimentales.

En cambio, en el 5-en-esteroide, el ángulo C4-C5-C10-C19 sería de aproximadamente 60°, mientras que en el caso de los 4-en y 2,4-dienesteroides el ángulo C6-C5-C10-C19 adoptaría ese valor, produciéndose en todos los casos una interacción  $\beta(\text{CC})$  sobre el C5. Esta suposición se vio avalada por el hecho que en estos tres últimos esteroides la señal correspondiente al C5 apareció a campos similares (144,5 ppm), algo inferiores a la misma señal en el caso del 3,5-dien-derivado (141,2 ppm).

Las consideraciones respecto de la no existencia de un efecto  $\beta(\text{CC})$  sobre C5 en el caso de 102, son igualmente válidas respecto del mismo efecto sobre C10. Por lo tanto el C10 tendría también un efecto  $\beta(\text{CC})$  menos que los considerados por Beierbeck y colaboradores<sup>28</sup>.

Respecto de la predicción del  $\delta$  de los carbonos olefínicos, en general las mayores diferencias se produjeron en el cálculo del C5. En los cuatro casos calculados (pregn-4-en-, -5-en-,

-2,4-dien- y -3,5-dien-20-ona) se observaron errores superiores a - 3,4 ppm (en todos los casos en defecto). Esto podría deberse a que el valor base del cual se partió (137,8 ppm) no fuera el correcto. Dicho valor fue calculado <sup>28</sup> en base a 16 carbonos cuaternarios en distintos sistemas anulares (pimaradienos, ergostadien y trienos, colest-3,5-dieno, lanost-en y dienos,  $\beta$ -amirina y germanicol) correspondiendo el 50 % de los casos al C8 (en  $\Delta^7$ ,  $\Delta^{8(9)}$  y  $\Delta^{8(14)}$ ). Por esa razón, el valor base indicado estaría muy influenciado por el caso particular de dicho carbono cuaternario, provocando las discrepancias observadas en el cálculo del  $\delta$  del C5, el cual contribuyó con un solo ejemplo, (colesta-3,5-dieno) en el cálculo del carbono cuaternario  $sp^2$  básico.

En base a los esteroides que poseen el C5  $sp^2$  entre los compuestos analizados ( $\Delta^4$ ,  $\Delta^5$ ,  $\Delta^{2,4}$  y  $\Delta^{3,5}$ -esteroides) se calculó un valor base para el mismo de 142,3 ppm, correspondiente al promedio del  $\delta$  del C5 en dichos esteroides, luego de restársele 1,85 ppm debido a una interacción  $\beta(CC)$  en los casos en que esta se encuentra presente. Dicho valor difiere en 3,5 ppm del valor base para ese tipo de carbono, propuesto por Beierbeck y colaboradores <sup>28</sup>. Utilizando el valor base así calculado, los  $\delta$  predichos para el C5 en  $\Delta^4$ ,  $\Delta^5$  y  $\Delta^{2,4}$ -20-cetopregnano sería de 144,2 ppm mientras que para el  $\Delta^{3,5}$ -esteroide sería de 142,3 ppm, los cuales se ajustan mucho mejor (- 1,4/+1,1 ppm) a los valores experimentales.

Como conclusión, el método semiempírico de cálculo de en RMN-<sup>13</sup>C propuesto por Beierbeck y colaboradores <sup>28</sup> predice en forma adecuada la posición de las señales correspondientes a los carbonos de los anillos A, B y C y metilos angulares de los esteroi

des analizados, especialmente cuando se parte del esqueleto esteroi-  
dal base y se adicionan ó sustraen las interacciones que aparecen o  
desaparecen por introducción de los distintos sustituyentes presen-  
tes.

### III.3.2. Pregn-4-en-3,20-dionas, sus 1-en-derivados y 20-metilen análogos:

Los efectos de los hidroxilos  $11\beta$ ,  $17\alpha$  y  $21$  sobre los es-  
queletos de progesterona (1),  $\Delta^1$ -progesterona (9) y 20-metil-preg-  
na-4,20-dien-3-ona (95) (en este último caso solo los hidroxilos  
 $17\alpha$  y  $21$ ) fueron calculados como (X)-(1); ( $\Delta$ X)-(9) y (20MX)-(95)  
donde (X), ( $\Delta$ X) y (20MX) representan los diferentes monohidroxi pro-  
gesteronas,  $\Delta^1$  progesteronas y 20-metilen- $\Delta^4$ -3-cetopregnanos respec-  
tivamente. Los resultados se resumen en la tabla III-15.

Por otro lado se calculó el efecto del doble enlace 1,2  
como el promedio de los valores ( $\Delta$ Y)-(Y), donde (Y) y ( $\Delta$ Y) represen-  
tan el par  $\Delta^4$ -3-ceto/ $\Delta^1$ , $\Delta^4$ -3-ceto pregnano igualmente sustituidos.  
Dichos valores se dividieron entre los que se producen en presencia  
de un hidroxilo  $11\beta$  y en los  $11$ -desoxiderivados (tabla III-15).

Como puede verse en la tabla III-15 se observaron diferen-  
cias significativas en el efecto del hidroxilo  $11\beta$  en los  $\Delta^1$ , $\Delta^4$ -3-ce-  
toesteroides respecto del mismo efecto sobre los  $\Delta^4$ -3-cetoanálogos  
sobre C1, C2, C7, C9, C14 y C19. Se observaron también diferencias,  
aunque de menor monta, en el efecto sobre C3, C5 y C18 (se mencionan  
solo las diferencias mayores de 0,15 ppm).

El efecto del hidroxilo 17 fue practicamente el mismo so

Tabla III-15: Efectos de sustituyentes en el  $\delta$  de los carbonos de pregn-4-en-3,20-diona (A),  
pregna-1,4-dien-3,20-diona (B) y 20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (C).

C	OH-11 $\beta$		OH-17 $\alpha$		OH-21		$\Delta^1$	
	A	B	A	B	A	B	11 $\beta$ -H	11 $\beta$ -OH
1	- 0,62	+ 0,29	+ 0,03	- 0,02	+ 0,09	- 0,26	+ 0,01	+119,59
2	- 0,06	+ 0,41	+ 0,03	+ 0,04	+ 0,05	+ 0,11	- 0,04	+ 93,55
3	- 0,03	+ 0,20	+ 0,08	+ 0,02	- 0,14	- 0,13	b	- 13,06
4	- 1,48	- 1,39	+ 0,03	+ 0,04	+ 0,16	+ 0,12	+ 0,02	- 0,01
5	+ 1,03	+ 0,86	+ 0,07	- 0,09	- 0,36	- 0,40	- 0,09	- 2,02
6	- 0,67	- 0,77	+ 0,08	+ 0,08	- 0,01	- 0,02	- 0,04	- 0,01
7	+ 0,78	+ 0,35	+ 0,16	+ 0,08	+ 0,08	+ 0,01	- 0,04	+ 1,55
8	- 4,15	- 4,29	- 0,03	- 0,03	+ 0,09	+ 0,05	+ 0,06	- 0,11
9	+ 2,86	+ 3,50	- 0,29	- 0,34	+ 0,03	- 0,06	- 0,04	- 1,50
10	+ 0,71	+ 0,58	+ 0,02	+ 0,03	+ 0,05	- 0,04	+ 0,07	+ 4,86
11	+47,17	+47,20	- 0,47	- 0,49	- 0,01	- 0,12	- 0,03	+ 1,77
12	+ 9,61	+ 9,63	- 8,55	- 8,44	- 0,19	- 0,24	- 0,25	- 0,14
13	- 0,90	- 0,94	+ 4,27	+ 4,29	+ 0,81	+ 0,78	- 0,10	+ 0,16
14	+ 1,55	+ 1,19	- 6,00	- 5,97	+ 0,16	+ 0,08	+ 0,13	- 0,44
15	+ 0,01	+ 0,05	- 0,41	- 0,43	+ 0,17	+ 0,15	- 0,05	+ 0,16
16	- 0,08	- 0,12	+10,71	+10,73	+ 0,19	+ 0,10	+ 0,33	- 0,03
17	+ 0,39	+ 0,35	+26,30	+26,31	- 4,34	- 4,37	- 3,98	- 0,15
18	+ 2,56	+ 2,38	+ 2,07	+ 2,06	+ 0,14	+ 0,12	+ 0,09	- 0,08
19	+ 3,67	+ 2,41	+ 0,08	+ 0,07	+ 0,08	+ 0,02	+ 0,01	+ 0,07
20	- 0,30	- 0,28	+ 2,29	+ 2,24	+ 0,93	+ 0,83	+ 3,38	- 0,09
21	- 0,24	- 0,22	- 3,63	- 3,58	+37,89	+37,89	- 0,94	- 0,02
20-CH <sub>3</sub>				- 3,47 <sup>c</sup>		+42,22 <sup>c</sup>		+ 0,03

a) En los 20-metil- $\Delta^{20}$ -esteroides la hidroxilación corresponde en realidad al 20-CH<sub>3</sub>.

b) No se observaron estas señales (ver tabla III-13, pág. 210).

c) Corresponden genéticamente al C21 en A y B.

bre el sistema  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto que sobre el  $\Delta^4$ -3-ceto, salvo una pequeña diferencia en el efecto sobre el C5, mientras que en el caso del hidroxilo 21 se observaron diferencias solo en el efecto sobre C1.

Las diferencias observadas en el efecto del hidroxilo 11 sobre C1 y C2, y del hidroxilo 21 sobre el C1, podría deberse al cambio de hibridización de dichos carbonos cuando se pasa del  $\Delta^4$ -al  $\Delta^{1,4}$ -derivado. Las otras diferencias observadas en el caso del hidroxilo 11/3 probablemente se deban a distorsiones conformacionales y diferentes efectos estéricos.

El cambio del oxígeno 20 por un metileno, afectó notablemente el efecto de los hidroxilos 17 $\alpha$  y 21 sobre todo el esqueleto esteroidal. Respecto del primero, se observaron diferencias significativas en su efecto sobre C12, C13, C15, C16, C17 y C18, y diferencias menores en C5, C7, C8, C9, C11, C20 y C21, es decir que sufrieron diferencias mayores de 0,15 ppm en el efecto del hidroxilo 17 trece de los 21 carbonos del esteroide.

El efecto del hidroxilo-21 se vio modificado en cuanto a los carbonos 13, 17, 20, 21 y, en menor medida C5 y C15. Cabe destacar que el efecto del hidroxilo 21 solo fue importante, en los 20-cetoesteroides, sobre los carbonos del anillo D y la cadena lateral, siendo estos justamente los que experimentaron un efecto distinto.

Las notables diferencias observadas en el efecto de los hidroxilos 17 $\alpha$  y 21, por transformación del grupo 20-ceto en el 20-metilen análogo, puede explicarse debido a la cercanía de los sustituyentes con la modificación estructural.

Tanto el hidroxilo 17 $\alpha$  como el 21 interactúan con el car

bonilo 20 por formación de puentes de hidrógeno (ver III.5., pág. 244), mientras que en el caso de los 20-metilenderivados dicha interacción no existe. Por lo tanto en la  $17\alpha$  ó  $21$  hidroxilación de los 20-metilenesteroides se observa el efecto de dichos hidroxilos como tales, mientras que en el caso de los 20-cetopregnanos el efecto sería en realidad la diferencia entre el efecto del grupo  $17\beta$ -COCH<sub>3</sub> y los grupos ( $17\alpha$ -OH,  $17\beta$ -COCH<sub>3</sub>) y  $17\beta$ -COCH<sub>2</sub>OH respectivamente. Un antecedente de esta consideración se encuentra en las tablas descriptas por Zürcher<sup>88</sup> para el cálculo de los  $\delta$  de los metilos 18 y 19 en RMN-<sup>1</sup>H. Allí el autor presentó el efecto del grupo ( $17\alpha$ -OH,  $17\beta$ -COCH<sub>3</sub>), el cual es distinto a la suma de los efectos de los grupos  $17\alpha$ -OH y  $17\beta$ -COCH<sub>3</sub>. Otro tanto sucedió con el "sustituyente" ( $17\alpha$ -OH,  $17\beta$ -COCH<sub>2</sub>OH).

Blunt y Stothers<sup>105</sup> presentaron también, en tablas para el cálculo del  $\delta$  en RMN-<sup>13</sup>C, el efecto de los "grupos" ( $17\alpha$ -OH,  $17\beta$ -COCH<sub>3</sub>) y ( $17\alpha$ -OH,  $17\beta$ -COCH<sub>2</sub>OH).

El efecto del hidroxilo  $11\beta$  es el único que puede ser analizado a la luz de la teoría desarrollada por Beierbeck y colaboradores<sup>28</sup>, discutida anteriormente, ya que es el único de los sustituyentes analizados que se encuentra sobre uno de los anillos de seis miembros del esteroide, para los cuales se encuentra desarrollada la teoría. Según dicha teoría los metilos 18 y 19 sufrirían un efecto  $\delta$  de aproximadamente 2,86 ppm, el cual sería igual para ambos y en ambas estructuras ( $\Delta^4$  y  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroides). Dicho efecto  $\delta$  se produce cuando los grupos analizados se encuentran en relación sin-1,3-diaxial. El apartamiento de la conformación teórica indicada sería el causante de las diferencias observadas en el efec

to del hidroxilo  $11\beta$  (este hecho será analizado en mayor detalle en III.4., pág. 232).

C10 y C13 sufrirían un efecto  $\delta'$  (inductivo) debido a la introducción del hidroxilo  $11\beta$  (- 1,28 ppm), mientras que en el C8, además de dicho efecto se produciría la desaparición de un efecto  $\beta(\text{HC})$  debido a la desaparición del hidrógeno  $11\beta$  (- 1,28 - 4,55 ppm). En todos los casos se observaron efectos algo menores aunque de orden similar al predicho.

Por último C12 y C9 adicionarían uno y dos efectos  $\beta(\text{CO})$  respectivamente, mientras que sobre el primero se ejercería además una interacción  $\beta(\text{HO})$  debido a la 11-hidroxilación (+6,69 y +4,56 ppm). Dichos efectos indicados difirieron considerablemente con los observados, tanto en los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides (+ 9,61 y + 2,86 ppm) como en los  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoderivados (+ 9,63 y + 3,50 ppm). Beierbeck y Saunders <sup>107</sup> calcularon el  $\delta$  de algunos carbonos de  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2) hallando las mismas discrepancias aquí indicadas.

La teoría no justificó tampoco los efectos observados sobre el resto de los carbonos esteroidales, los cuales no deberían modificarse. Esto podría deberse a distorsiones esteroidales debidas a la introducción del hidroxilo (a través, por ejemplo, de su interacción estérica con los metilos 18 y 19). Si la presencia de un doble enlace 1,2 adicional afectara el grado de dichas distorsiones, modificaría en consecuencia los efectos correspondientes. Estas distorsiones se analizarán en mayor detalle en III.4., pág. 232.

Respecto del efecto de la introducción del doble enlace 1,2 se observaron diferencias en C1, C2, C3, C7, C9, C14 y C19 se



gún se trate de 11-hidroxiesteroides o de los 11-desoxiderivados correspondientes (tabla III-15, pág. 220).

En base a los efectos de los sustituyentes analizados, se calcularon los espectros de los esteroides di y trihidroxilados. El cálculo se realizó en base al esqueleto insaturado correspondiente y los efectos determinados en los mismos esqueletos (progesterona (1) para las di y trihidroxipregna-4-en-3,20-dionas,  $\Delta^1$ -progesterona (2) para los  $\Delta^1$ -derivados de los esteroides anteriores y 20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (95) para su 17 $\alpha$ ,21-dihidroxiderivado (99)).

En general las desviaciones respecto de los valores observados fueron pequeñas ( $\pm 0,4$  ppm), salvo cuando la interacción entre los sustituyentes es importante (por ejemplo los hidroxilos 17 $\alpha$  y 21 en cortexolona (2), cortisol (8),  $\Delta^1$ -cortexolona (15),  $\Delta^1$ -cortisol (16) y 17 $\alpha$ -hidroxi-20-(hidroximetil)-pregna-4,20-dien-3-ona (99)). Se observaron también algunas diferencias en los carbonos directamente afectados (por ejemplo C11 y C17 en 21-desoxicortisol (5)) donde el efecto del sustituyente es grande y por lo tanto pequeñas diferencias porcentuales del mismo conducen a mayores discrepancias (en ppm) en el valor calculado.

Si se analizan los errores en forma porcentual, hubo muy pocos casos en que la discrepancia superó el 1 %. Por ejemplo, en los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides dihidroxilados se apartaron en más del 1 % el C11 en 5, C16 en corticosterona (6) y C15, C16, C17, C18 y C21 en 2 (estos últimos debido a la fuerte interacción entre los sustituyentes).

Las mayores diferencias entre los espectros calculados y los experimentales, se produjeron en los trihidroxiesteroides 8 y 15, las cuales se deberían en gran medida a que dichos espectros fueron realizados en  $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$  (95:5) en lugar de  $\text{CDCl}_3$ , debido a la poca solubilidad de los esteroides en este último solvente. El efecto del agregado de  $\text{CD}_3\text{OD}$  sobre los espectros de algunos de los compuestos analizados se discutirá en III.5., pág. 244.

Como ejemplo de un espectro adecuadamente predicho se presenta en la tabla III-16 el caso de corticosterona (6), y como ejemplo de fuerte interacción entre los sustituyentes se detalla el cálculo de cortexolona (7).

Según la teoría de Beierbeck y colaboradores<sup>28</sup>, el efecto que ejerce el hidroxilo 17 sobre el C21 se debería a dos razones:

- Eliminación de la interacción  $\beta(\text{HC})$  entre el H17 y los H21, debido al reemplazo del primero.
- Efecto  $\gamma$ , de caracter inductivo (figura 67).

Del mismo modo la hidroxilación en C21 produce un efecto  $\gamma$  sobre el C17 y elimina uno de los hidrógenos que, interactuando con el H17, produciría el efecto  $\beta(\text{HC})$ . Además el hidroxilo 21 causaría la rotación de la cadena lateral hacia una conformación preferencial diferente, la cual podría no ser la adecuada para que se produzca la interacción entre los hidrógenos que dan lugar al efecto  $\beta(\text{HC})$  (figura 67).

En presencia del hidroxilo 17 $\alpha$ , la introducción de otro

Tabla III-16: Cálculo de los espectros RMN- $^{13}\text{C}$  de corticosterona (6) y cortexolona (7) en base a los efectos de sustituyentes indicados en la tabla III-15 (pág. 220).

C	6 calc.	$\Delta^a$	7 calc.	$\Delta^a$
1	35,13	+ 0,15	35,78	+ 0,11
2	33,36	+ 0,09	33,95	+ 0,07
3	198,86	- 0,08	198,97	- 0,16
4	122,43	+ 0,15	123,94	+ 0,11
5	171,25	- 0,06	170,29	- 0,21
6	32,03	+ 0,11	32,78	+ 0,04
7	32,71	+ 0,18	32,09	+ 0,07
8	31,44	+ 0,10	35,56	- 0,11
9	56,46	+ 0,20	53,31	+ 0,02
10	39,27	+ 0,13	38,58	+ 0,03
11	68,14	+ 0,23	20,50	- 0,08
12	48,03	+ 0,14	29,87	- 0,27
13	43,74	+ 0,07	48,91	+ 0,36
14	57,65	+ 0,23	50,10	- 0,19
15	24,50	+ 0,11	24,08	+ 0,36
16	22,91	+ 0,47	33,70	- 0,84
17	59,45	+ 0,08	85,36	- 3,57
18	16,01	+ 0,05	15,52	+ 0,50
19	21,08	+ 0,13	17,49	+ 0,10
20	209,47	- 0,06	212,06	+ 0,11
21	69,06	- 0,01	65,67	- 1,66

a)  $\delta_{\text{calc.}} - \delta_{\text{obs.}}$  ( $\delta_{\text{obs.}}$  en tabla III-12, pág. 205).

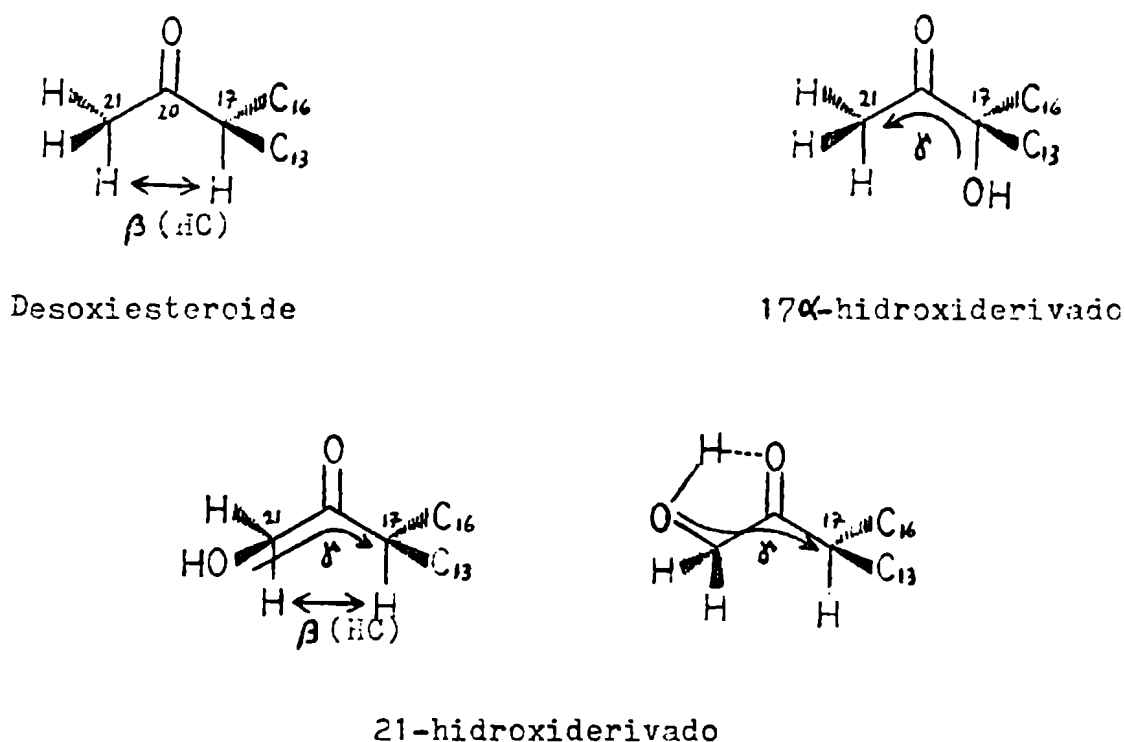


Figura 67: Efectos del hidroxilo 17 $\alpha$  sobre el C21, y del hidroxilo 21 sobre el C17.

hidroxilo sobre C21 solo produciría el efecto inductivo (considerando que este no se modifica por la presencia de la otra funcionalidad) ya que dicha introducción no elimina ninguna interacción H-H sin-1,3-diaxial (efecto  $\beta$ (HC)) dado que no existe el H17. Por lo tanto el efecto de la introducción de un hidroxilo en posición 21 sería considerablemente menor en los 17 $\alpha$ -hidroxiesteroideos que en los 17-desoxi análogos a partir de uno de los cuales se calculó el efecto utilizado (11-desoxicorticosterona (4)).

Del mismo modo es posible realizar un análisis similar para la introducción del hidroxilo 17 $\alpha$  en presencia del hidroxilo 21, donde también se encontraría disminuido (aunque no eliminado

totalmente) el efecto  $\beta(\text{H}^{\text{C}})$  por menor interacción H17-H21 preexistente. Por lo tanto el efecto del hidroxilo 17 $\alpha$  sobre el C21 también sería menor en los 21-hidroxiesteroides.

Queda descartada la posibilidad de que las diferencias observadas se debieran a distintos grados de interacción de los hidroxilos con el carbonilo 20 ubicado entre ellos, cuando se encuentran ambos presentes, ya que las discrepancias analizadas también se produjeron en los 20-metilen derivados.

Se calcularon también los espectros de los esteroides di y trihidroxilados que poseen en su estructura el sistema  $\Delta^{1,4}$ -3-ceto, y el espectro de 17 $\alpha$ -hidroxi-20-(hidroximetil)-pregna-4,20-dien-3-ona (99) a partir de los desoxiesteroides base correspondientes (9 y 95 respectivamente) pero utilizando los efectos de los hidroxilos 11 $\beta$ , 17 $\alpha$  y 21 obtenidos a partir de las pregn-4-en-3,20-dionas, para verificar la importancia de utilizar los parámetros calculados a partir de modelos de igual esqueleto insaturado.

La predicción de espectros resultó considerablemente mejor cuando se utilizaron los efectos de sustituyentes calculados en base a compuestos monohidroxilados con igual esqueleto esteroide insaturado. Las mayores discrepancias observadas cuando se utilizaron parámetros calculados a partir de núcleos base distintos se produjeron cuando el grupo funcional considerado se encontraba en las cercanías de las diferencias del esqueleto. Es así que las diferencias más notorias se produjeron en el cálculo de 99 posiblemente debido a que en el 20-ceto esteroide los hidroxilos interactuarían con dicho oxígeno (puente de hidrógeno), actuando el conjun

to resultante como un todo, distinto del efecto individual de cada grupo. En cambio en los 20-metilen derivados los hidroxilos actuarían como tales sin afectar la acción de otros grupos.

Modificaciones en zonas del esqueleto esteroideal alejadas de los grupos funcionales considerados no alterarían el efecto de los mismos y, por lo tanto, podrían utilizarse efectos de grupos funcionales calculados en un esqueleto esteroideal para el cálculo de espectros de esteroides con distinto núcleo base, en tanto y en cuanto las modificaciones del mismo se encuentren en regiones alejadas de la funcionalidad adicionada.

Un buen ejemplo de esto es el cálculo del espectro de  $17\alpha$ -hidroxi-3,20-dimetilen-pregn-4-eno (86) a partir del esqueleto de su 17-desoxiderivado 85 (tabla III-17). Cuando se utilizaron los parámetros para el hidroxilo  $17\alpha$  calculados en la serie de los 20-metilenesteroides, la predicción fue excelente (la mayor discrepancia fue de 0,17 ppm) pese a que el esteroide en cuestión presenta un grupo metileno unido al C3 en lugar del oxígeno, que poseen los esteroides modelo en base a los cuales se calculó el efecto del hidroxilo- $\alpha$ . En cambio, cuando se utilizaron los efectos calculados a partir de los derivados de progesterona (1), las diferencias fueron considerablemente mayores (nueve carbonos difirieron en más de 0,2 ppm).

Por último se calcularon los  $\Delta^1$ -esteroides a partir de la adición del efecto del doble enlace 1,2 a los dihidro análogos correspondientes. En este caso nuevamente se observó el requerimiento de igualdad "regional". El efecto del doble enlace fue el mis-

Tabla III-12: Cálculo del espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de  $17\alpha$ -hidroxi-20-metil-3-metilen-pregna-4,20-dieno (86) a partir de los efectos del hidroxilo  $17\alpha$  determinados en progesteronas y en 20-metilen- $\Delta^4$ -3-cetoesteroides (tabla III-15).

C	Calc. I <sup>a</sup>	$\Delta^b$	Calc. II <sup>c</sup>	$\Delta^b$
<u>1</u>	37,23	+ 0,03	37,31	+ 0,06
<u>2</u>	29,65	- 0,02	29,72	+ 0,05
<u>3</u>	d	d	149,02	+ 0,12
<u>4</u>	122,51	- 0,02	122,49	- 0,04
<u>5</u>	143,66	- 0,14	143,83	+ 0,03
<u>6</u>	32,41	- 0,03	32,49	+ 0,05
<u>7</u>	32,67	- 0,01	32,83	+ 0,15
<u>8</u>	36,37	- 0,08	36,19	- 0,26
<u>9</u>	53,83	+ 0,06	54,01	+ 0,24
<u>10</u>	37,47	+ 0,01	37,49	+ 0,03
<u>11</u>	21,26	+ 0,17	21,01	- 0,08
<u>12</u>	31,11	- 0,10	30,22	- 0,99
<u>13</u>	47,03	- 0,07	47,41	+ 0,31
<u>14</u>	50,00	+ 0,01	49,90	- 0,09
<u>15</u>	23,19	- 0,02	23,79	+ 0,58
<u>16</u>	35,15	+ 0,03	36,10	+ 0,98
<u>17</u>	86,14	+ 0,04	83,50	- 2,60
<u>18</u>	15,38	- 0,08	14,86	- 0,60
<u>19</u>	18,43	- 0,04	18,51	+ 0,04
<u>20</u>	147,99	+ 0,12	147,70	- 0,17
<u>21</u>	112,39	- 0,12	e	e
3=CH <sub>2</sub>	e	e	e	e
20-CH <sub>3</sub>	21,13	- 0,14	20,97	- 0,30

a) A partir del efecto del hidroxilo  $17\alpha$  en 20-metilenesteroides.

b)  $\delta$ (calculado) -  $\delta$ (observado).

c) A partir del efecto del hidroxilo  $17\alpha$  en progesteronas.

d) No pudo ser determinado el efecto sobre este C (ver tabla III-15).

e) No existe el carbono correspondiente en los esteroides modelo.

no en el caso de progesterona (1) como en el caso de sus derivados 17 $\alpha$  y/o 21 hidroxilados (3, 4 y 2). En cambio, la presencia del hidroxilo 11 $\beta$ , mucho más cercana, modificó notablemente dicho efecto (ver tabla III-15, pág. 220).

Como conclusión de lo antedicho se desprende que los requerimientos para una buena predicción de espectros en RMN-<sup>13</sup>C en base al efecto de los sustituyentes presentes no serían tan extremos como los propuestos por Eggert y Djerassi <sup>91</sup> (efectos calculados en el mismo esqueleto poliinsaturado), sino que solo sería necesario que los grupos funcionales mencionados tengan el mismo entorno químico en el esteroide que se analiza y en los patrones en base a los cuales se calcularon los efectos. Dicha igualdad en el entorno químico se refiere tanto a la presencia de insaturaciones como de cualquier otro sustituyente que pudiera interactuar directa ó indirectamente con el que se analiza (por ejemplo el carbono 20 con los hidroxilos 17 $\alpha$  ó 21 como interacción directa, y el hidroxilo 11 $\beta$  con el doble enlace 1,2 como interacción indirecta).



- Análisis conformacional de pregn-4-en-3,20-dionas y pregna-1,4-dien-3,20-dionas:

III.4. Análisis conformacional en base al efecto de sustituyentes en el desplazamiento químico de los carbonos esteroidales.

#### GENERALIDADES:

Como se mencionara anteriormente, los efectos indicados por Beierbeck y colaboradores <sup>28</sup> que determinan la frecuencia de resonancia de un carbono, requieren de relaciones espaciales perfectamente determinadas. El efecto  $\beta(\text{HC})$  que se produce por interacción entre dos hidrógenos en relación sin-1,3-diaxial es de 4,5 ppm cuando la conformación es la indicada, pero se apartará del valor indicado si se produce alguna distorsión en dicha conformación.

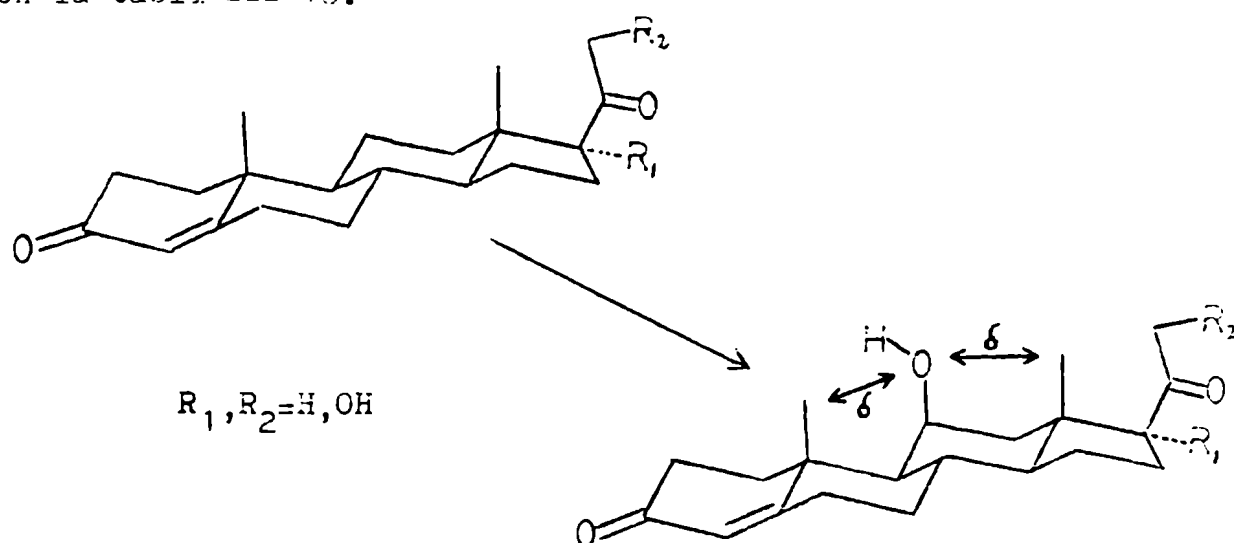
La aparición de efectos de sustituyentes en regiones del esteroide suficientemente alejadas como para descartar una acción directa, sería indicativa de alteraciones conformacionales del esqueleto esteroideal que modificarían la interacción de los grupos preexistentes, causando dichos corrimientos. Por lo tanto, mediante el análisis de dichos efectos sería posible obtener una "visión" de las modificaciones de la conformación del esqueleto esteroideal (o al menos de una región del mismo) debidas a la introducción de distintos sustituyentes.

## RESULTADOS Y DISCUSION:

### III.4.1. Doble enlace 1,2:

Un aspecto que puede ser analizado en el campo conformacional es la distorsión del esqueleto de los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides debido a la introducción de un doble enlace 1,2. Esta distorsión puede ser estudiada por comparación del efecto  $\delta$  que se produce sobre los carbonos 18 y 19 debido al hidroxilo  $11\beta$ .

Beierbeck y colaboradores <sup>23</sup> indicaron que dicho efecto es de naturaleza estérica, dependiendo de la distancia espacial entre los átomos considerados (C18 ó C19 con el  $O_{11\beta}$ ). El efecto  $\delta$  sobre C18 y C19 se calcula como la diferencia de desplazamiento químico de dichas señales en un  $11\beta$ -hidroxiesteroide y en el 11-deoxianálogo correspondiente (figura 68). Los resultados se resumen en la tabla III-18.



**Figura 68:** Efecto  $\delta$  entre un hidroxilo en posición  $11\beta$  y los metilos 18 y 19.

Tabla III-18: Efecto " $\delta$ " del hidroxilo  $11\beta$  sobre los metilos 18 y 19 en pregn-4-en-3,20-dionas y sus  $\Delta^1$ -derivados.

Est. <sup>a</sup>	C-18	" $\delta$ " <sup>b</sup>	$\Delta$ <sup>c</sup>	C-19	" $\delta$ " <sup>b</sup>	$\Delta$ <sup>c</sup>
<u>1</u>	13,31	-	-	17,33	-	-
<u>2</u>	15,87	2,56	-	21,00	3,67	-
<u>3</u>	15,33	-	-	17,41	-	-
<u>5</u>	18,00	2,62	-	21,01	3,60	-
<u>4</u>	13,45	-	-	17,41	-	-
<u>6</u>	15,96	2,51	-	20,95	3,54	-
<u>7</u> <sup>d</sup>	14,94	-	-	17,43	-	-
<u>8</u> <sup>d</sup>	17,34	2,40	-	20,89	3,46	-
$\langle \Delta^{4-3-ceto} \rangle^e$	-	2,52	-	-	3,57	-
<u>9</u>	13,40	-	-	18,65	-	-
<u>10</u>	15,78	2,38	0,18	21,06	2,41	1,26
<u>11</u>	15,46	-	-	18,72	-	-
<u>13</u>	17,94	2,48	0,14	21,08	2,36	1,24
<u>12</u>	13,52	-	-	18,67	-	-
<u>14</u>	15,87	2,35	0,16	21,04	2,37	1,17
<u>15</u> <sup>d</sup>	14,98	-	-	18,63	-	-
<u>16</u> <sup>d</sup>	17,26	2,28	0,12	20,94	2,31	1,15
$\langle \Delta^{1,4-3-ceto} \rangle^f$	-	2,37	0,15	-	2,36	1,21

a) Ver estructura correspondiente en figura 46, pág. 130.

b)  $\delta$  ( $11\beta$ -hidroxiesteroide) -  $\delta$  ( $11$ -desoxiesteroide correspondiente)

c) efecto " $\delta$ " ( $\Delta^{1,4}$ -esteroide) - efecto " $\delta$ " ( $\Delta^4$ -esteroide corresp.)

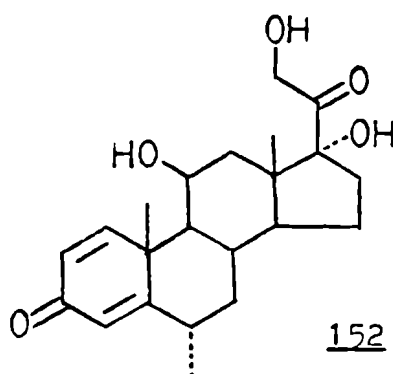
d) Espectros realizados en  $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$  (95:5).

e,f) Valores de efecto " $\delta$ " y  $\Delta$  promedio en  $\Delta^4$ - y  $\Delta^{1,4}$ -esteroides respectivamente.

En los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides se calculó un valor promedio en el efecto  $\delta$  del hidroxilo  $11\beta$  de 3,57 ppm para el C19 y de 2,52 ppm sobre el C18, mientras que en los  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroides los valores correspondientes fueron de 2,36 y 2,37 ppm respectivamente. Por lo tanto en el primer grupo de esteroides habría una mayor interacción (y por lo tanto menor distancia) entre el C19 y el O $11\beta$  que entre dicho oxígeno y el C18.

La introducción de un doble enlace 1,2 produce la disminución del efecto  $\delta$  sobre ambos carbonos, especialmente sobre el C19 haciendo que practicamente se igualen, indicando por lo tanto la igualdad en las distancias C19-O $11\beta$  y C18-O $11\beta$ .

Estas conclusiones están de acuerdo con datos de rayos X <sup>81</sup> los cuales, para el estado cristalino, indicaron que en cortisol (8) las distancias C18-O $11\beta$  y C19-O $11\beta$  eran de 2,99 y 2,87 Å respectivamente, es decir que el C19 se encuentra más cerca (y por lo tanto interactuaría en mayor proporción) del O $11\beta$  que el C18. También concuerda con datos cristalográficos de  $11\beta,17\alpha,21$ -trihidroxi-6 $\alpha$ -metil-pregna-1,4-dien-3,20-diona (152) para el cual las distancias C18-O $11\beta$  y C19-O $11\beta$  serían de 2,96 y 2,97 Å respectivamente (iguales y por lo tanto iguales los efectos  $\delta$  correspondientes).



Cabe destacar la sensibilidad del método, donde una variación en la distancia de  $0,1 \text{ \AA}$  produjo una diferencia en el efecto  $\delta$  de aproximadamente 1 ppm. Esto se debe a que en general en los efectos en RMN que dependen de la distancia, esta aparece como potencia sexta ( $r^{-6}$ ) y por lo tanto, pequeñas modificaciones de la misma producen grandes variaciones en los efectos observados.

El aumento en las distancias indicado corresponde a una mayor curvatura del núcleo esteroidal hacia la cara  $\alpha$  debido a la introducción del doble enlace 1,2; esta curvatura sería más pronunciada entre los anillos A y B que entre los anillos C y D.

Schmit y Rousseau <sup>17</sup> confirmaron por cálculos de minimización de energía que la introducción de un doble enlace en posición 1,2 del esteroide produciría un aumento en la curvatura del anillo A hacia la cara  $\alpha$  del mismo para estructuras libres de interacciones externas. Los resultados aquí expuestos indican que esas conclusiones también son válidas en solución.

La introducción de un doble enlace en posición 1,2 produce sobre C9 (según la teoría desarrollada por Beierbeck y colaboradores) <sup>28</sup> la eliminación de una interacción  $\beta(\text{HC})$  entre los hidrógenos 1 y 9 ( $- 4,55 \text{ ppm}$ ), suponiendo que H1 y H9 se encuentran en la conformación ideal de interacción, además de generar un efecto  $\gamma$  sobre dicho carbono ( $5,23 \text{ ppm}$ ). Por lo tanto el efecto teórico del doble enlace 1,2 sobre C9 sería de  $+ 0,68 \text{ ppm}$ .

El efecto realmente observado fue de  $- 1,50 \text{ ppm}$  (tabla III-15, pág. 220) en el caso de los 11-desoxiesteroides, es decir  $2,18 \text{ ppm}$  menos que el valor esperado.

También se produjeron corrimientos hacia campos altos en las señales de C12 (- 0,14 ppm) y C14 (- 0,44 ppm). En cambio la señal del C7 se corrió hacia campos más bajos por introducción de la insaturación (+ 1,55 ppm), cuando la teoría indica que dichas señales no deberían modificarse.

Las principales interacciones que sufren estos cuatro carbonos mencionados, son las que se producen entre los hidrógenos axiales correspondientes (efectos  $\beta(\text{HC})$ ), como se indica en la figura 69. Los hidrógenos de posiciones  $16\alpha$  y  $17\alpha$ , no se tuvieron en cuenta cuando se consideraron las interacciones sin-1,3-diaxiales, debido a que dado que se encuentran sobre un anillo de cinco miembros, estos no presentarían la conformación adecuada para interactuar correctamente. Algo similar fue considerado anteriormente en el caso del cálculo teórico del  $\delta$  del C8 en 20-cetopregnanos donde no se consideró la interacción H8-H15 (pág. 213).

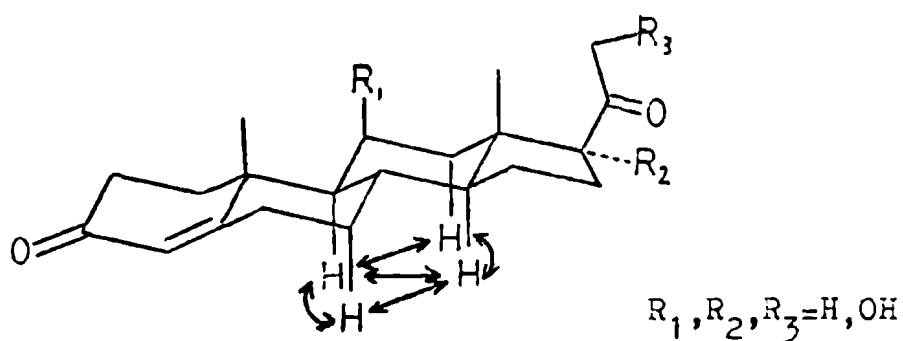


Figura 69: Interacciones sin-1,3-diaxiales entre los hidrógenos  $7\alpha$ ,  $9$ ,  $12\alpha$  y  $14$ .

Efectos negativos por la introducción de un doble enlace indicarían el alejamiento neto del hidrógeno correspondiente del resto de los hidrógenos con los que interactúa, mientras que un efecto positivo indicaría acercamiento. Cabe destacar que el alejamiento o acercamiento entre dos hidrógenos afecta por igual a los carbonos a los que están unidos. Por otra parte debe tenerse en cuenta que el alejamiento entre dos hidrógenos se puede producir tanto por un alejamiento "lineal" entre los mismos, como mediante un apartamiento de la planaridad del sistema H-H 1,3-diaxial.

Por lo tanto el H7 se acercaría al H9, al H14 o a ambos. Sin embargo el efecto sobre dichos carbonos indicó que los hidrógenos correspondientes sufrirían un alejamiento neto.

Suponiendo que el H7 se acercara al H14 y que mantuviera su relación espacial con el H9, entonces el C14 sufriría una desprotección de + 1,55 ppm debido al acercamiento indicado. Por lo tanto el H14 debería alejarse del H9, del H12 o de ambos, de forma tal que se produjera una protección de - 1,99 ppm que compensara y superara la desprotección anterior. Suponiendo además que dicha protección en su totalidad se debiera a una menor interacción H14-H9 y que la pequeña protección del C12 se debiera también a una menor interacción con el H9, el C9 sufriría una protección total de - 2,13 ppm (- 1,99 - 0,14 ppm), valor sumamente aproximado al realmente observado (- 2,18 ppm).

Por lo tanto, de valer las suposiciones realizadas, no se modificaría la disposición espacial relativa de los pares H7-H9 y H12-H14, mientras que el H14 se acercaría al H7, alejándose simultáneamente del H9. Por último H9 y H12 se alejarían levemente entre sí.

Esta sería la explicación más simple, existiendo otras combinaciones de acercamientos-alejamientos que justificarían los corrimientos observados. Sin embargo en todos los casos debe producirse el acercamiento H7-H14 y el alejamiento H9-H14. Las posibles modificaciones serían acercamientos o alejamientos de las distancias asumidas como fijas por simplicidad. Dichos cambios deberían ser compensados entonces por alejamientos o acercamientos adicionales respecto de los otros hidrógenos.

En el caso de los 11 $\beta$ -hidroxiesteroides la oxidación 1,2 produciría un menor acercamiento H7-H14 (+ 1,26 ppm), mientras que las distancias H7-H9 y H12-H14 permanecerían nuevamente sin modificarse. En cuanto al alejamiento H9-H14 sería similar (- 0,66 - 1,26 ppm = - 1,92 ppm) al del caso anterior (11-desoxiesteroides). Tampoco se modificaría mayormente el alejamiento H9-H12.

Respecto del corrimiento de la señal del C9, este fue considerablemente menor que en los 11-desoxiesteroides, pese a que las modificaciones de los efectos  $\beta$ (HC) serían las mismas para este carbono. El corrimiento hacia campos más bajos se debería a un aumento de la interacción  $\beta$ (CO) entre el C10 y el O11 $\beta$ , debido a la disminución del ángulo diedro C10-C9-C11-O11. Dicha disminución se produciría durante la torsión de los anillos B y C, debida a la introducción del doble enlace 1,2. Este efecto no existe en los 11-desoxiesteroides, de allí las diferencias observadas.

Las distorsiones mencionadas, hechas evidente por el análisis de los efectos a larga distancia, producidas por la introducción del doble enlace 1,2, pueden ser explicadas mediante el torque de los anillos B y C, acercándose el metilo 19 al C5 mientras se a



leja el metilo 18 del C14, el cual produce el acercamiento H7-H14 a la vez que se produce el alejamiento H9-H14.

En los trabajos de Schmit y Rousseau, ya mencionados, se indica la existencia de dicha distorsión en estructuras libres de interacciones externas, determinada (por minimización de energía) mediante la modificación del ángulo diedro que forman las uniones C10-C19 y C13-C18<sup>14</sup>. También en el estado sólido<sup>81</sup> se verificó esta alteración conformacional. Queda así demostrada la validez de estos resultados en solución.

#### III.4.2. Hidroxilo 11 $\beta$ :

En forma similar a lo discutido anteriormente, es posible analizar aproximadamente que sucede con el esqueleto esteroideal en cuanto a su conformación general con la introducción de un hidroxilo en posición 11 $\beta$ .

En los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides se observó un pequeño desplazamiento hacia campos altos de la señal de C1 (- 0,62 ppm) cuando se pasó de un 11-desoxiesteroide al 11 $\beta$ -hidroxiderivado correspondiente. Este efecto a larga distancia podría deberse a la disminución de la interacción  $\beta$ (HC) entre H1 y H9. Esto explicaría porque el corrimiento de la señal de C9 debido a la 11 $\beta$ -hidroxilación es menor en el caso de los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides, que en sus 1,2-deshidroderivados (+ 2,86 ppm frente a +3,50 ppm).

El efecto directo ( $\beta$ (HO) y  $\beta$ (CO)) del hidroxilo 11 $\beta$  sobre C9 y C12 no justifica la totalidad del desplazamiento hacia campos bajos de las señales correspondientes. Además C7 y C14 sufren tam

bién corrimientos hacia campos bajos, imposibles de justificar por efectos directos del hidroxilo. Esto indicaría el aumento de las interacciones  $\beta(\text{HC})$  que se producen entre los hidrógenos axiales de C7, C9, C12 y C14, lo cual se debería al acercamiento entre sí de dichos hidrógenos.

El acercamiento de los hidrógenos axiales de la cara  $\alpha$  del esteroide indica la curvatura del esqueleto esteroidal en los anillos B y C hacia dicha cara. La curvatura indicada era de esperarse ya que la interacción estérica entre los metilos angulares y el hidroxilo  $11\beta$  tendería a alejar dichos grupos, lo cual se lograría con la flexión del esqueleto esteroidal.

Cálculos de minimización de energía <sup>14</sup> indicaron también la curvatura del esqueleto esteroidal hacia la cara  $\alpha$  del mismo (reflejado en la modificación del ángulo formado por los planos de los anillos A y D). El presente trabajo confirma en el estado líquido el mismo comportamiento.

#### III.4.3. Hidroxilo $17\alpha$ :

La difracción de rayos X de progesterona (1) y  $17\alpha$ -hidroxiprogestero (3) <sup>81</sup> indicó diferencias conformacionales en el anillo A de los mismos en el estado cristalino. En el caso de 1 la conformación correspondió al tipo  $1\alpha$ -sofá distorsionado (figura 70) mientras que en el caso de 3 la conformación fue  $1\alpha,2\beta$ -semisilla distorsionada (figura 70). Las diferencias se adjudicaron a un posible efecto a larga distancia del hidroxilo  $17\alpha$  y no al empaquetamiento cristalino.

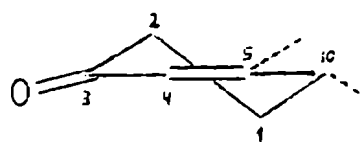
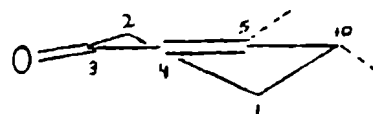
1 $\alpha$ ,2 $\beta$ -semisilla1 $\alpha$ -sofá

Figura 70: Conformaciones 1 $\alpha$ -sofá y 1 $\alpha$ ,2 $\beta$ -semisilla del anillo A (referencia 81).

En cambio, estudios de conformación por minimización de energía indicaron que la conformación más estable en el anillo A sería la 1 $\alpha$ ,2 $\beta$ -semisilla <sup>17</sup>.

El efecto del hidroxilo 17 $\alpha$  en el  $\delta$  de los carbonos 1 y 2 en los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides fue practicamente nulo (+0,03 ppm en ambos casos, ver tabla III-15, pág. 220), lo cual avalaría los cálculos teóricos en cuanto a la no existencia de un efecto a larga distancia. De producirse esta, la señal de C1 se vería notablemente afectada dado que en la conformación semisilla el H1 se encuentra en una disposición muy adecuada para interactuar con el H9 (efecto  $\beta$ (HC)), mientras que en el caso de la conformación 1 $\alpha$ -sofá no se observa la planaridad requerida entre los hidrógenos mencionados. Por lo tanto, de existir dicha distorsión debería haberse observado un notable corrimiento hacia campos más bajos de la señal del C1 (y de C9), lo cual no se produjo.

La distorsión en la conformación en el cristal se debería, entonces, al empaquetamiento en la red cristalina.

## III.4.4. Hidroxilo 21:

En un trabajo previo de RMN- $^{13}\text{C}$  de corticoides <sup>67</sup> se indicó que en desoxicorticosterona (4) el hidroxilo 21 estaría orientado en forma preferencial hacia el mismo lado que el hidrógeno 17 y por lo tanto no estaría eclipsando el carbonilo 20. Esta conclusión fue alcanzada suponiendo que el corrimiento hacia campos altos del C17 por introducción del hidroxilo 21 se debería a la interacción directa entre el H17 y dicho hidroxilo. Sin embargo como se indicara en el punto anterior de este capítulo (pág. 198), la explicación en términos de la disminución de interacciones H-H sin-1,3-diaxial no requiere necesariamente que el hidroxilo 21 se encuentre eclipsando el H17 .

En estudios sobre el agregado de  $\text{CD}_3\text{OD}$  al solvente, en el espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de distintos esteroides que se detallan en el siguiente punto de este capítulo (pág. 244), se encontraron pruebas que avalan que el hidroxilo 21 no se encontraría eclipsando el H17 $\alpha$ , sino que se ubicaría preferencialmente paralelo al carbonilo 20 con el cual formaría un puente de hidrógeno. Este resultado estaría de acuerdo con datos obtenidos por rayos X en el estado sólido <sup>12</sup>.

Respecto del esqueleto esteroideal, este no se vería afectado en cuanto a su conformación debido a la 21-hidroxilación ya que el efecto de dicha sustitución sobre los carbonos del ciclopentanoperhidrofenantreno base fue de poca significación (ver tabla III-15, pág. 220).

### III.5. Efecto del solvente.

#### RESULTADOS Y DISCUSION:

La tabla III-19 resume el efecto del agregado de  $\text{CD}_3\text{OD}$  (5 %), un dador y aceptor de puentes de hidrógeno, en los espectros de los esteroides progesterona (1),  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2),  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (3), 11-desoxicorticosterona (4), cortexolona (7),  $\Delta^1$ -cortexolona (15), 20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (95), sus derivados  $17\alpha$  y/o 21 hidroxilados (97, 98 y 99), 3,20-dimetilen-pregna-4-eno (85) y su  $17\alpha$ -hidroxiderivado (86), expresados como  $\delta(\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}) - \delta(\text{CDCl}_3)$ .

Como puede verse, los espectros de los esteroides no oxigenados (85 y 86) practicamente no se modificaron por el agregado de  $\text{CD}_3\text{OD}$  al solvente (tanto los carbonos alifáticos como los olefínicos). Del mismo modo, tampoco sufrieron mayores alteraciones las señales de los carbonos alejados de los sistemas oxigenados, en el resto de los esteroides (C7, C14 y C15 en todos los esteroides analizados, C8, C11 y C12 en los 11-desoxiderivados, C13 y C16 en los 17-desoxiesteroides). En estos casos se observó una tendencia hacia campos bajos de aproximadamente + 0,05 ppm, posiblemente debido a un pequeño corrimiento del tetrametilsilano (TMS), respecto del cual se miden los  $\delta$ , cuando se reemplazó el  $\text{CDCl}_3$  por  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  como solvente.

En los nueve  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides analizados se observaron corrimientos de aproximadamente 1 y 1,3 ppm hacia campos más bajos en la resonancia de C3 y C5 respectivamente, debido al aumento de

Tabla III-19: Efecto del agregado de  $\text{CD}_3\text{OD}$  en los espectros  $\text{RMN-}^{13}\text{C}$  de distintos esteroides <sup>a</sup>.

C	1	2	3	4	7	15	35	38	95	97	98	99
1	-	-0,16	-0,10	-0,09	+0,07	+0,91	+0,05	+0,01	-0,08	-0,09	-0,10	-0,13
2	-0,01	-0,05	-0,08	-0,07	-0,02	-0,30	+0,04	+0,01	-0,10	-0,09	-0,10	-0,04
3	+0,98	+1,10	+0,98	+1,02	+0,90	+0,56	+0,09	-0,03			+1,01	+0,87
4	-0,12	-0,24	-0,18	-0,21	-0,16	-0,32	+0,06	-0,03	-0,21	-0,25	-0,22	-0,22
5	+1,19	+1,40	+1,31	+1,28	+1,28	+1,17	+0,06	-0,03	+1,43	+1,53	+1,37	+1,23
6	+0,14	+0,11	+0,12	+0,10	+0,17	+0,10	+0,05	-0,03	+0,11	+0,12	+0,11	+0,12
7	+0,08	+0,05	+0,03	+0,01	+0,05	+0,07	+0,07	-0,02	+0,01	+0,05	+0,02	+0,08
8	+0,16	+0,09	+0,12	+0,07	+0,29	+0,06	+0,06	-0,01	+0,01	+0,03	-	+0,01
9	+0,11	-	+0,05	+0,05	+0,09	+0,11	+0,05	+0,01	+0,06	+0,06	+0,03	+0,11
10	+0,17	+0,16	+0,12	+0,14	+0,15	+0,27	+0,04	+0,01	+0,23	+0,13	+0,10	+0,13
11	+0,11	-0,42	+0,12	+0,04	+0,16	+0,15	+0,04	-0,03	+0,02	+0,04	+0,05	+0,05
12	+0,07	-0,25	+0,22	+0,01	+0,20	+0,18	+0,04	+0,01	+0,02	+0,05	+0,01	+0,02
13	+0,16	+0,20	-0,40	+0,05	-0,39	-0,53	+0,04	-0,04	+0,07	+0,02	-	-0,04
14	+0,10	+0,06	+0,12	+0,02	+0,09	+0,05	+0,04	-0,02	+0,02	+0,07	+0,05	+0,01
15	+0,06	+0,04	-0,11	+0,02	+0,07	+0,01	+0,04	-	+0,02	+0,01	+0,01	+0,06
16	+0,12	-0,01	-0,28	+0,01	-0,18	-0,25	+0,04	-0,02	+0,01	-0,22	+0,03	-0,26
17	+0,14	+0,13	+0,07	-	-0,01	-0,08	+0,04	-0,02	+0,02	-0,04	-	-0,21
18	+0,03	-0,12	-0,16	+0,01	-0,08	-0,11	+0,01	+0,01	+0,01	+0,03	-0,02	-0,06
19	+0,07	-0,10	-	-	+0,04	-0,05	+0,03	-0,03	-0,04	-0,02	-0,04	-0,02
20	+0,92	+1,06	+0,70	+0,27	+0,50	+0,45	+0,05	+0,02	+0,07	-0,05	-0,16	+0,12
21	+0,04	-	-0,23	-0,11	-0,19	-0,29	+0,04	-0,01	+0,01	-0,09	-0,26	-0,65
22 <sup>b</sup>							+0,03	+0,01	+0,02	-0,14	-0,43	-0,64
23 <sup>c</sup>							+0,03					

a)  $\delta(\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}) - \delta(\text{CDCl}_3)$ . Ver estructuras correspondientes en figuras 46 y 47, pág. 130 y 131.

b)  $20\text{-CH}_2\text{R}$  R=H, OH.

c)  $3=\text{CH}_2$ .

la polarización del sistema conjugado, por formación de puentes de hidrógeno entre el carbonilo y el  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Por la misma razón se afectaron las señales del resto del anillo A y C6. Como era de esperarse, de ser correcta la justificación anterior, cuando se reemplazó el carbonilo 5 por un grupo metileno, manteniendo la hibridización del C3, pero eliminando la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno con el solvente, desaparecieron los corrimientos observados anteriormente.

En el único  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroide presente en la tabla (compuesto 15) puede observarse la disminución del efecto del  $\text{CD}_3\text{OD}$  principalmente sobre C3 y en menor medida en el C5. Se produjo además una importante modificación en el efecto sobre C1 y, en menor medida, sobre C2. En el  $\Delta^1$ -derivado la relación estructural del C1 con C3 es similar a la de este último con el C5 y, por lo tanto, se produjo un efecto similar sobre ambos. Otro tanto sucede con C2 y C4. En el resto de los carbonos de 15 se produjeron corrimientos similares a los observados en 7, debido al cambio de solvente.

En presencia de un hidroxilo en posición  $11\beta$ , el agregado de  $\text{CD}_3\text{OD}$  al solvente produjo el corrimiento hacia campos altos de las señales correspondientes a C11 ( $\text{C}\alpha$ ), C9 ( $\text{C}\beta$ ), C12 ( $\text{C}\beta$ ), C18 y C19. Estos dos últimos interactúan estéricamente con el hidroxilo formando sistemas sin-1,3-diaxiales. Aparentemente, en presencia de  $\text{CD}_3\text{OD}$  se reduciría levemente dicha interacción.

Los carbonos 13 y 16 se afectaron por el  $\text{CD}_3\text{OD}$  en presencia de un hidroxilo en posición  $17\alpha$ , en forma similar a lo que sucedió con los carbonos  $\beta$  al hidroxilo  $11\beta$  (C9 y C12). El efecto del  $\text{CD}_3\text{OD}$  sobre los carbonos  $\beta$  a un hidroxilo fue siempre de protección

aunque el valor numérico resultó bastante variable (-0,53/-0,06 ppm).

En cambio la señal del C17 no se modificó en los 17 $\alpha$ -hidroxisteroides, a diferencia de lo que sucedió con el C11 en 2.

La presencia de un hidroxilo en posición 21 no afectó los corrimientos debidos al CD<sub>3</sub>OD en el esqueleto esteroideal.

La información más importante que pudo extraerse del efecto del CD<sub>3</sub>OD se obtuvo del comportamiento del C20 frente al agregado de este solvente, en presencia de los hidroxilos 17 $\alpha$  y/o 21, la cual permitió obtener una visión de la conformación de la cadena lateral con distinta funcionalidad.

Cuando el C20 se encontraba funcionalizado como carbonilo, sufrió una desprotección de aproximadamente 1 ppm por agregado de CD<sub>3</sub>OD en ausencia de los hidroxilos 17 $\alpha$  y/o 21. El corrimiento fue practicamente igual al que sufrió el carbonilo 3 en los  $\Delta^4$ -3-ceto esteroides.

En presencia de un hidroxilo 17 $\alpha$  el efecto del CD<sub>3</sub>OD resultó algo menor (0,7 ppm) y mucho menor en presencia del hidroxilo 21 (0,27 ppm). Cuando se encontraban presentes ambos hidroxilos, la disminución del efecto del CD<sub>3</sub>OD fue intermedia (0,50 ppm).

Estas disminuciones observadas en el efecto del CD<sub>3</sub>OD admiten dos orígenes posibles (o la combinación de ambos):

- Efecto de tipo inductivo del CD<sub>3</sub>OD a través de los hidroxilos 17 $\alpha$  y/o 21 sobre el C20 (C $\beta$ ), superpuesto con el efecto directo del CD<sub>3</sub>OD sobre el carbonilo.
- Los hidroxilos formarían puentes de hidrógeno con el carbonilo,



disminuyendo el número de sitios de unión libres con los cuales pueda interactuar el  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Para determinar si se producía el efecto inductivo y, de existir, si este era el causante de toda la merma en el efecto sobre el carbonilo, resultó de suma utilidad el análisis del efecto del  $\text{CD}_3\text{OD}$  en los 20-metilenesteroides 95, 97, 98 y 99. En estos casos los hidroxilos  $17\alpha$  y 21 solo pueden actuar sobre el C20 a través de un mecanismo inductivo ya que no pueden formar puentes de hidrógeno intramoleculares.

Como puede verse en la tabla III-19, el  $\text{CD}_3\text{OD}$  produjo pequeños desplazamientos sobre el C20 olefínico en presencia de hidroxilos en posición  $17\alpha$  y/o 21 debido a efectos inductivos. En ausencia de dichos grupos funcionales el desplazamiento observado fue igual al que sufrieron el resto de los carbonos esteroidales, salvo el anillo A y el C6 que se vieron afectados por el sistema  $\Delta^4$ -3-ceto. Sin embargo en ningún caso el efecto observado alcanzó a justificar las disminuciones observadas en el efecto del  $\text{CD}_3\text{OD}$  sobre el carbonilo-20 en presencia de los hidroxilos en cuestión. Por lo tanto también se produciría el segundo mecanismo que afecta el efecto del  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Para determinar la contribución de los puentes de hidrógeno en la merma del efecto del cambio de solvente sobre el carbonilo 20 se descontó el efecto inductivo calculado en los 20-metilenanálogos, suponiendo que dicho efecto inductivo fuera el mismo en ambos casos. Los resultados se resumen en la tabla III-20.

El hidroxilo  $17\alpha$  se encontraría entonces formando puente

Tabla III-20: Discriminación del efecto del  $\text{CD}_3\text{OD}$  sobre el carbonilo 20 en presencia o ausencia de los hidroxilos 17 $\alpha$  y 21.

	Efecto <sup>(a)</sup> total.	Efecto <sup>(b)</sup> inductivo.	Puente <sup>(c)</sup> de H con $\text{CD}_3\text{OD}$ .	Puente <sup>(d)</sup> de H intramol.
1	+ 0,97	+ 0,07	0,90	--
2	+ 0,70	- 0,05	0,75	17 %
4	+ 0,27	- 0,16	0,43	52 %
7	+ 0,50	+ 0,12	0,38	58 %

(a)  $\delta_{\text{C}20}(\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}) - \delta_{\text{C}20}(\text{CDCl}_3)$  en 20-cetoesteroides.

(b)  $\delta_{\text{C}20}(\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}) - \delta_{\text{C}20}(\text{CDCl}_3)$  en 20-metilenderivados.

(c) = (a) - (b)

(d) =  $\frac{(c)_1 - (c)_X}{(c)_1} \cdot 100$        $X = 2, 4, 7.$

de hidrógeno con el carbonilo 20 en una pequeña proporción (17 %). En cambio el hidroxilo 21 interactuaría con mayor eficiencia con dicha función cetónica, bloqueando el 52 % de los sitios de unión de la misma. En presencia de ambos hidroxilos el porcentaje de puentes de hidrógeno presentes fue mayor aún, aunque menor que la suma de los puentes formados por los hidroxilos en los compuestos monohidroxilados.

De no haberse considerado el efecto inductivo se hubiese arribado a conclusiones distintas ya que el análisis directo del efecto total indicaría que la presencia del hidroxilo 17 $\alpha$  dis

minuye considerablemente la formación de puentes de hidrógeno entre el hidroxilo 21 y el carbonilo 20. En cambio la corrección realizada determinó que en el compuesto dihidroxilado es donde se produce la mayor proporción de puentes de hidrógeno.

Trabajos anteriores no habían arribado a evidencias claras acerca de la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno en estos compuestos <sup>12,132,133</sup>.

Finalmente la pequeña diferencia entre el porcentaje de puentes de hidrógeno observados en 7 y la suma de los porcentajes de los hidroxilos individuales puede interpretarse como que los carbonilos involucrados en un puente de hidrógeno con uno de los hidroxilos, no puede formar puentes simultaneamente con el otro hidroxilo. Por lo tanto la disponibilidad del carbonilo para interactuar con cada hidroxilo sería menor. Las ecuaciones que permiten el cálculo del porcentaje de cada especie son las siguientes:

$$P_{21} = \frac{(100 - P_{17}) 52}{100}$$

$$P_{17} = \frac{(100 - P_{21}) 17}{100}$$

siendo  $P_{21}$  y  $P_{17}$  el porcentaje de carbonilos que forman puente de hidrógeno con los hidroxilos 21 y 17 respectivamente en el dihidroxiesteroide 7. 52 y 17 corresponden a los porcentajes de puente de hidrógeno en los monohidroxiesteroides 4 y 3 respectivamente.

Resolviendo este sistema de ecuaciones se arribó al resultado representado en la figura 71. Como puede verse el porcentaje total de puentes de hidrógeno (56 %) resultó notablemente similar

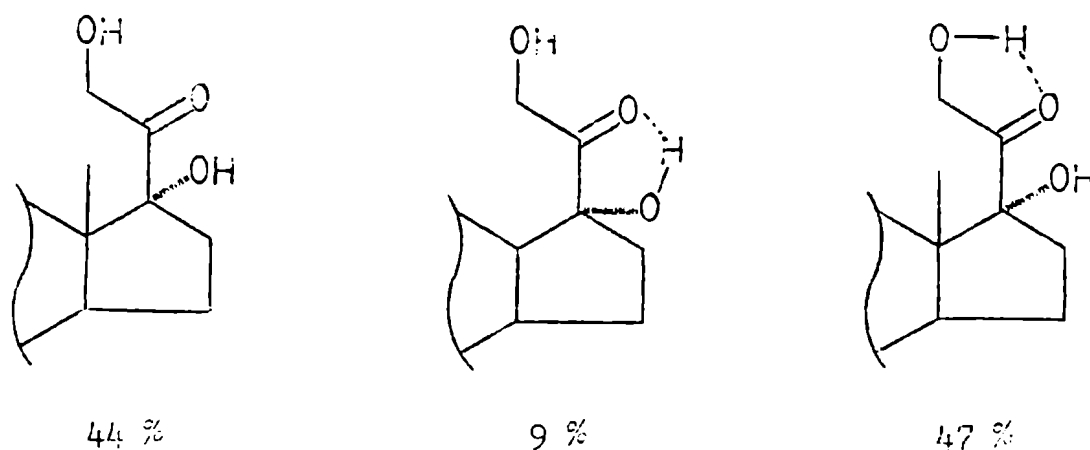


Figura 71: Formación de puentes de hidrógeno entre el carbonilo 20 y los hidroxilos 17 $\alpha$  y 21 en cortexolona (7).

al realmente observado (58 %).

El análisis de modelos moleculares confirmó que resulta muy poco probable la formación de puentes de hidrógeno simultáneamente con ambos hidroxilos, ya que la conformación de la cadena lateral requerida sería muy poco estable debido a la fuerte interacción estérica entre el metilo 18 y el metileno 21.

Saunders y colaboradores <sup>134</sup> analizaron el  $\delta$  del carbonilo 20 según se encuentren presentes o no los hidroxilos 17 $\alpha$  y/o 21. Los autores utilizaron como solvente el dimetilsulfóxido- $d_6$ . En dichas condiciones observaron un efecto similar de ambos hidroxilos sobre el  $\delta$  del carbonilo, efectos que se adicionaban cuando ambos se encontraban presentes. Los corrimientos fueron adjudicados a efectos inductivos.

Las diferencias observadas respecto de los resultados aquí

presentados, donde el corrimiento debido a cada hidroxilo fue distinto, se debe a que en  $\text{CDCl}_3$  se produce, además del efecto inductivo, la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, mientras que en dimetilsulfóxido- $\text{d}_6$  el puente de hidrógeno intramolecular se ve anulado debido al carácter fuertemente aceptor de puentes de hidrógeno del solvente.

### III.6. Determinación de las barreras rotacionales de metilos angulares por el método de Woessner.

#### GENERALIDADES:

La relajación dipolo-dipolo es el mecanismo de relajación predominante en núcleos de espín  $1/2$ , unidos a otros núcleos del mismo spin. Procesos de movimientos moleculares influyen en dicho mecanismo de relajación. Los movimientos mencionados pueden tratarse de los de la molécula como un todo, así como los de ciertas porciones de la misma respecto del resto. En particular, en el caso de los esteroides, resulta interesante la rotación de los metilos angulares 18 y 19 respecto del esqueleto esteroideal <sup>110</sup>. La velocidad de rotación de los metilos depende de la interacción de los mismos con otros átomos espacialmente cercanos, brindando datos acerca de la disposición tridimensional de la molécula.

Woessner desarrolló la herramienta matemática que permite determinar la rotación de un metilo en cualquier molécula, en forma aislada del movimiento global de la misma <sup>109</sup>, 10 años antes de la aparición de la instrumentación que permitiera la transformación de Fourier y, por lo tanto, la aplicación de la teoría de Woessner. Debido a esto, la teoría de Woessner encontró poca difusión.

La contribución de la relajación dipolo-dipolo ( $T_1(DD)$ ) a la relajación spin-red ( $T_1$ ) puede ser determinada a partir de este último parámetro y del incremento por efecto nuclear Overhauser ( $\eta$ ) a través de la ecuación:

$$T_1(DD) = \frac{T_1 \gamma_{(max)}}{\gamma}$$

donde, en el caso de la interacción  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$   $\gamma_{(max)} = 1,988$ .

El  $T_1(DD)$  de un  $^{13}\text{C}$  puede relacionarse con su tiempo de correlación efectivo ( $\gamma_c$ ) a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{T_1(DD)} = n \gamma_C^2 \gamma_H^2 \hbar^2 r_{CH}^{-6} \gamma_c$$

donde  $n$  corresponde al número de protones unidos al  $^{13}\text{C}$  que se relaja,  $\gamma_C$  y  $\gamma_H$  son las constantes giromagnéticas de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  respectivamente, y  $r_{CH}$  es la distancia de la unión C-H.

En condiciones de movimiento isotrópico sin movimientos internos, el tiempo de correlación se relaciona con el coeficiente de difusión de la molécula según la siguiente ecuación:

$$\gamma_c = \frac{1}{6 D}$$

Cuando el movimiento molecular es anisotrópico aparecen tres coeficientes de difusión distintos según los tres ejes de referencia, complicándose notablemente la relación entre  $\gamma_c$  y los coeeficientes de difusión (en la referencia 135 se discuten algunos de estos casos).

La situación se complica aún más cuando además el átomo observado se encuentra en una región de la molécula que posee movilidad interna. En ese caso aparece un nuevo término de difusión co

correspondiente al coeficiente de difusión interna ( $D_i$ ).

Por último en el caso de los metilos, el eje de rotación de los mismos puede o no coincidir con el eje preferencial de difusión general.

En general, salvo casos muy particulares, se utiliza la aproximación de movimientos isotrópicos. Se simplifica así notablemente el problema ya que, además de reducir los coeficientes de difusión general a uno solo, esto hace que el eje de rotación interna del metilo coincida con el molecular, ya que este último no tiene una dirección preferencial debido al movimiento isotrópico.

Existe, además, una última consideración sobre el movimiento de un metilo:

- El movimiento puede ser tal que todas las orientaciones del metilo tengan igual probabilidad (movimiento I).
- El movimiento del metilo se produce por rápidos saltos entre algunas posiciones determinadas (por ejemplo las posiciones alternadas, donde la interacción estérica de los hidrógenos con los sustituyentes del carbono a que está unido el metilo es mínima) (movimiento II).

No existe consenso acerca de cual de estos mecanismos resulta el más apropiado <sup>135</sup>.

Las ecuaciones resultantes para la relajación de metilos luego de la aproximación anterior son (para ambos tipos de movimientos):



$$\frac{1}{T_1(\text{DD})} = 3 \gamma_C^2 \gamma_H^2 \hbar^2 r_{\text{CH}}^{-6} \left( \frac{A}{6D} + \frac{B}{6D + D_i} + \frac{C}{6D + 4D_i} \right)$$

$$\frac{1}{T_1(\text{DD})} = 3 \gamma_C^2 \gamma_H^2 \hbar^2 r_{\text{CH}}^{-6} \left( \frac{A}{6D} + \frac{B + C}{6D + \frac{3}{2}D_i} \right)$$

para los movimientos I y II respectivamente. A, B y C son factores geométricos determinados por el ángulo  $\Delta$  entre el vector que conecta el dipolo (en este caso la unión C-H) y el eje de rotación interna (C-CH<sub>3</sub>)<sup>135</sup>.

Si se dispone del valor de D, es posible calcular D<sub>i</sub> a partir de las ecuaciones anteriores. D puede ser calculado a partir del T<sub>1</sub>(DD) de un carbono rígido de la molécula, el cual solo sufriría el movimiento isotrópico general. Por lo tanto, mediante la determinación de T<sub>1</sub> y  $\eta$  del metilo y de un carbono del esqueleto rígido de la molécula es posible calcular la rotación interna del metilo.

Para simplificar los cálculos usualmente se realiza el cociente entre las ecuaciones que relacionan los T<sub>1</sub>(DD) con los coeficientes de difusión general (D) e interna (D<sub>i</sub>) para el carbono que interesa (metilo) y para un carbono del esqueleto rígido de la molécula. En general se elige un metino, resultando:

$$\frac{T_1^{\text{CH}}(\text{DD})}{T_1^{\text{CH}_3}(\text{DD})} = 18 \left( \frac{A}{6} + \frac{B}{6 + \rho} + \frac{C}{6 + 4\rho} \right)$$

$$\rho = \frac{D_i}{D}$$

$$\frac{T_1^{\text{CH}}(\text{DL})}{T_1^{\text{CH}_3}(\text{DD})} = 18 \left( \frac{A}{6} + \frac{B+C}{6+\rho} \right)$$

para los movimientos I y II respectivamente.

Con el fin de transformar  $D_i$  en la barrera de rotación del metilo ( $V_0$ ) debería hacerse un estudio en función de la temperatura, obteniéndose una relación del tipo de la de Arrhenius:

$$D_i = D_{i0} \exp \left( - \frac{V_0}{R T} \right)$$

El tiempo de máquina requerido para este tipo de experimentos (además de la necesidad de variación de temperatura de la muestra) lo hacen poco práctico. En general se calcula  $V_0$  de la ecuación anterior a partir de  $D_i$  a una sola temperatura, conociendo  $D_{i0}$ . Este valor corresponde al coeficiente de difusión rotacional de un metilo cuya rotación es libre ( $V_0 = 0$ ) y corresponde a:

$$D_{i0} = \frac{k T}{I}^{1/2} = 0,86 \cdot 10^{13} \text{ s}^{-1} \quad (30^\circ\text{C})$$

donde  $I$  es el momento de inercia del grupo metilo <sup>136</sup>.

Debido a las varias suposiciones realizadas a lo largo de la deducción de las ecuaciones anteriores (movimiento isotrópico, eje de rotación interna coincidente con el eje general, derivación de  $V_0$  a partir de una sola temperatura), así como los errores de medición de  $T_1$  y  $\eta$ , del método de Woessner resultan valores semicuantitativos para las barreras de rotación. Sin embargo para

una serie de compuestos relacionados, medidos en iguales condiciones, muchos de los errores matemáticos y experimentales permanecen constantes, de modo que es posible utilizar el método en forma comparativa dentro de la serie <sup>135</sup>.

El único antecedente de un estudio comparativo en esteroides es el realizado por ApSimon y colaboradores <sup>110</sup>. Del mismo se desprende la utilidad de esta estrategia para el análisis conformacional. Los autores emplearon la aproximación de movimiento isotrópico para la molécula esteroideal (dado que el tiempo de relajación del C3, sobre el eje mayor del esteroide, no difería mayormente de los del resto de los carbonos del esqueleto esteroideal), y el movimiento homogéneo para los metilos ( $A = 1/9$ ;  $B = 8/27$ ;  $C = 16/27$ ). Por último consideraron que el único mecanismo de relajación era el dipolo-dipolo, considerando  $T_1 = T_1(DD)$  (es decir  $\eta = 1,988$ ).

En vista de los interesantes resultados obtenidos en la aplicación del método de Woessner para la determinación de la rotación de los metilos angulares de esteroides <sup>110</sup> y las alteraciones conformacionales que evidencian, se decidió ensayar este método sobre un glucocorticoide natural, corticosterona (6), y un mineralocorticoide, 11-desoxicorticosterona (4), con cierta actividad glucocorticoide. Resulta particularmente interesante analizar estos dos compuestos en busca de características conformacionales diferentes dada su similitud estructural y su diferente actividad biológica.

# RESULTADOS Y DISCUSION :

Para la medición de  $T_1$  se eligió la técnica de inversión recuperación rápida (inversión recuperación pero sin permitir la completa relajación de los carbonos entre cada secuencia de pulsos) <sup>137a</sup>. La secuencia de pulsos que permite la determinación del mismo se esquematiza en la figura 72.

Debido a la no relajación completa de los carbonos entre las secuencias de pulsos, lo cual disminuyó notablemente el tiempo de equipo requerido, fue necesario llevar el sistema a estado estacionario antes de la acumulación de datos, por lo cual se descartaron las cuatro primeras secuencias.

$$T_1 \quad \left[ (180_{+x} \text{---} T_m \text{---} 90_{+x} \text{---} \frac{\pm FID_{+y}}{(A_t)} \text{---} T')_n \right]_m$$

$$T_m = T_{m-1} + I_m$$

$$I_m = I_{m-1} + SI$$

$$T_f = 3 (T_{f-1})$$

Fase	FID <sub>+y</sub>
+x	+
-x	-

$$\eta \quad {}^{13}\text{C} \quad (T_a \text{---} 90_{+x} \text{---} FID_1 \text{---} T_b \text{---} 90_{+x} \text{---} FID_2)_n$$

$${}^1\text{H} \quad \overline{\text{BA}} \quad \overline{\text{BA}}$$

$$T_a = 6 T_1$$

$$T_b = 9 T_1$$

Figura 72: Secuencias de pulsos empleadas en la determinación del tiempo de relajación y efecto nuclear Overhauser de <sup>13</sup>C.

La ecuación que relaciona la intensidad de la señal observada con el tiempo de espera ( $T_m$ ) y  $T_1$  es la siguiente:

$$I_{\infty} - I_{T_m} = I_{\infty} \left[ 2 - \exp \left( - \frac{D'}{T_1} \right) \right] \exp \left( - \frac{T_m}{T_1} \right)$$

donde  $I_{T_m}$  y  $I_{\infty}$  son las intensidades de la señal de un carbono para un  $T_m$  cualquiera y  $T_m = \infty$  respectivamente;  $D' = A_t + T'$ .

Los  $T_1$  fueron calculados a partir de la ecuación anterior mediante una regresión no lineal de cuadrados mínimos <sup>138</sup>, la cual no requiere la determinación de  $I_{\infty}$ , principal fuente de error en regresiones lineales simples <sup>137b</sup> y cuya medición insu<sup>me</sup> un considerable tiempo de equipo.

La determinación de  $\eta$ , a través de la secuencia de pulsos esquematizada en la figura 72, fue realizada en base a la integración de los picos, ya que no fue posible realizarlo en base a sus alturas, debido al diferente ensanchamiento de los mismos.

Dado que no fue posible mantener la integración relativa entre los espectros con y sin efecto nuclear Overhauser (enO), se debió asignar el valor 2 (correspondiente a  $\eta = 1,988$ ) al pico de mayor incremento, calculándose el resto de los incrementos en base a este.

Se determinaron los  $T_1$  y  $\eta$  de los carbonos de 11-desoxicorticosterona (4) y corticosterona (6) a dos concentraciones diferentes (100-200 mg/ml) en  $CDCl_3$ . Los resultados se resumen en la tabla III-21. En la misma se indican también los  $T_1(DD)$  calculados a partir de los mismos.

Tabla III-21: Tiempo de relajación spin-red ( $T_1$ ), incremento por efecto nuclear Overhauser ( $\eta$ ) y Tiempo de relajación dipolo-dipolo ( $T_1(DD)$ ) de los carbonos alifáticos hidrogenados de 11-desoxicorticoesterona (4) y corticosterona (6).

C	<u>4</u>			<u>6</u>		
	100 mg/ml			200 mg/ml		
	$T_1$	$\eta$	$T_1(DD)$	$T_1$	$\eta$	$T_1(DD)$
<u>1</u>	1,03	1,6	1,29	0,61	2,0	0,61
<u>2</u>	1,02	1,6	1,28	0,54	1,6	0,68
<u>6</u>	1,00	1,6	1,25	0,55	1,7	0,65
<u>7</u>	0,94	1,8	1,04	0,53	1,9	0,56
<u>8</u>	1,80	1,6	2,23	1,07	2,0	1,07
<u>9</u>	1,77	1,6	2,21	0,95	1,8	1,06
<u>11</u>	0,95	1,6	1,19	0,61	1,7	0,72
<u>12</u>	1,00	2,0	1,00	0,65	1,7	0,76
<u>14</u>	2,03	1,9	2,13	1,05	1,6	1,31
<u>15</u>	0,96	1,6	1,20	0,63	2,0	0,63
<u>16</u>	0,90	1,6	1,13	0,60	1,8	0,66
<u>17</u>	1,94	1,6	2,43	1,35	1,7	1,59
<u>18</u>	2,84	1,9	2,99	1,80	1,6	2,25
<u>19</u>	2,22	1,9	2,33	1,53	1,6	1,91
<u>21</u>	1,54	1,8	1,71	0,78	1,6	0,98
				0,76	1,6	0,96
				0,50	1,8	0,55
				0,49	1,8	0,55
				0,49	1,6	0,61
				0,50	1,6	0,62
				0,88	1,8	0,98
				0,85	1,8	0,95
				0,85	1,8	0,95
				0,46	1,8	0,51
				0,86	2,0	0,86
				0,47	1,6	0,58
				0,43	1,8	0,47
				0,85	1,6	1,06
				1,02	1,8	1,14
				1,41	1,6	1,76
				0,76	1,6	0,96
				0,32	1,8	0,36
				0,28	1,6	0,35
				0,31	1,8	0,35
				0,32	1,8	0,35
				0,62	1,8	0,69
				0,62	1,8	0,69
				0,66	1,9	0,70
				0,28	1,6	0,35
				0,55	1,6	0,69
				0,32	1,8	0,36
				0,28	1,6	0,35
				0,67	2,0	0,67
				0,79	2,0	0,79
				1,23	2,0	1,23
				0,62	2,0	0,62

Se describen los valores para los carbonos alifáticos solamente, ya que los olefínicos (C4 y C5) y los carbonílicos (C3 y C20) se hallan en una región del espectro muy alejada de la frecuencia del pulso y, por lo tanto, reciben su influencia en forma inadecuada <sup>137</sup>c. Tampoco se indican los carbonos cuaternarios (C10 y C13) debido a que el rango de  $T_m$  utilizado no es el adecuado para el cálculo de los  $T_1$  correspondientes, considerablemente mayores.

Según se deduce de la ecuación que relaciona  $T_1(DD)$  con  $\tau_c$ , todos los átomos de carbono de la parte rígida de la molécula (esqueleto esteroideal) con igual número de átomos de hidrógeno unidos ( $n$ ) deberían poseer igual  $T_1(DD)$ . Además los carbonos unidos a un átomo de hidrógeno ( $n=1$ ) tendrían un valor de  $T_1(DD)$  doble del correspondiente a los metilenos ( $n=2$ ).

Como puede verse en la tabla III-21 esto se cumplió para todos los átomos del esqueleto esteroideal, tanto en 4 como en 6 a las dos concentraciones analizadas.

En cambio el  $T_1(DD)$  correspondiente al C21 ( $n=2$ ) resultó notablemente mayor que el del resto de los metilenos presentes. Esto puede explicarse con facilidad teniendo en cuenta la posibilidad de rotación interna de la cadena lateral, lo cual disminuye el  $\tau_c$  del C21 y, por lo tanto, aumenta su  $T_1$ .

Otro tanto sucedió con los metilos angulares, como era de esperarse, ya que a pesar de ser los carbonos unidos al mayor número de hidrógenos ( $n=3$ ) son los que presentaron (dentro de los carbonos analizados) los  $T_1(DD)$  más largos. Esto indicó además la importancia de la rotación interna de los mismos.

Para la aplicación del método de Woessner al caso particular de 4 y 6 se realizó la suposición de movimiento isotrópico y se ensayaron los dos mecanismos de rotación (movimientos I y II).

Cabe destacar que se realizó una pequeña modificación en el método general. Para evaluar en forma más ajustada el valor de  $D$ , en lugar de usarse el  $T_1(DD)$  de un metino individual, se realizó el promedio de los  $nT_1(DD)$  de todos los carbonos del esqueleto esteroideal (metilenos y metinos). Como puede verse en la ecuación que relaciona  $T_1(DD)$  y  $\tau_c$  el valor  $nT_1(DD)$  debe ser el mismo para todos los carbonos de la porción rígida de la molécula. Además, cuando se divide la ecuación de  $T_1(DD)$  de los metilos en función de los coeficientes de difusión, por la ecuación de un metino, es posible hacer dicha división por el  $nT_1(DD)$  de cualquier otro carbono del esqueleto rígido ( $n$  en el caso de los metinos es = 1) y de igual modo por el valor de  $nT_1(DD)$  promedio, resultando (reemplazando además  $A$ ,  $B$  y  $C$  por los valores indicados por ApSimon y colaboradores <sup>134</sup>):

$$\frac{nT_1(DD)}{T_1^{CH_3}(DD)} = \frac{1}{3} \left( 1 + \frac{16}{6 + \rho} + \frac{16}{3 + 2\rho} \right)$$

$$\frac{nT_1(DD)}{T_1^{CH_3}(DD)} = \frac{1}{3} \left( 1 + \frac{48}{6 + \rho} \right)$$

para los movimientos I y II (tres posiciones preferenciales) respectivamente. En el primer caso el cálculo de  $\rho$  y, por lo tanto de  $D_i$ , implica la resolución de una ecuación de segundo grado, mientras que

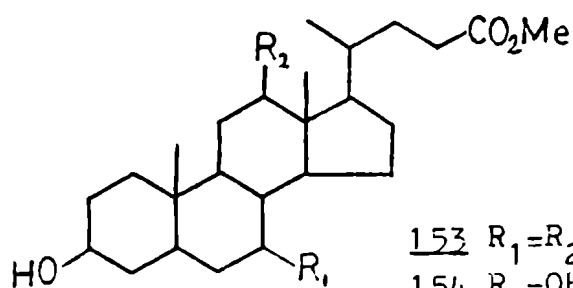


en el caso del movimiento de a saltos (II) se obtiene una ecuación de primer grado.

Finalmente, para el cálculo de la barrera de rotación de los metilos se aplicó la ecuación del tipo de la de Arrhenius, mencionada anteriormente, utilizando  $D_{10} = 0,86 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$  ( $30^{\circ}\text{C}$ ) <sup>136</sup>.

Los resultados se resumen en la tabla III-22, donde se observa que tanto en 11-desoxicorticosterona (4) como en su 11 $\beta$ -hidroxiderivado (6), aumentó la movilidad molecular al disminuir la concentración, probablemente debido a una disminución de la viscosidad con la dilución <sup>139</sup>. En cambio no se modificó mayormente la rotación de los metilos, la cual no depende de la viscosidad sino de interacciones intramoleculares.

Cabe destacar la considerable diferencia apreciada en la movilidad de 4 y 6 a igual concentración, posiblemente debido al aumento en la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares en  $\text{CDCl}_3$ , lo cual disminuye la movilidad de la molécula. Algo similar fue informado en el caso de 3-hidroxicolenatos de metilo hidroxilados en posiciones 7 y/o 12 (compuestos 153-156) <sup>139</sup>, obser



153  $R_1=R_2=\text{H}$

154  $R_1=\text{OH}, R_2=\text{H}$

155  $R_1=\text{H}, R_2=\text{OH}$

156  $R_1=R_2=\text{OH}$

Tabla III-22: Coeficientes de difusión general del esteroide y de difusión interna de los metilos 18 y 19 en 11-desoxi corticosterona (4) y corticosterona (6).

	Esteroides	<u>4</u>		<u>6</u>	
	Concentr. <sup>a</sup>	100	200	100	200
	$\langle NT_1(DD) \rangle^b$	2,36	1,30	1,05	0,70
	D <sup>c</sup>	8,50	4,64	3,77	2,50
Movimiento I <sup>d</sup>	$\rho$ (18)	13	28	9	10
	$\rho$ (19)	8	19	26	30
	D <sub>i</sub> (18) <sup>c</sup>	112	132	36	26
	D <sub>i</sub> (19) <sup>c</sup>	65	87	99	74
	V <sub>o</sub> (18) <sup>e</sup>	1,53	1,43	2,21	2,40
	V <sub>o</sub> (19) <sup>e</sup>	1,85	1,68	1,60	1,77
Movimiento II <sup>f</sup>	$\rho$ (18)	29	59	21	23
	$\rho$ (19)	18	40	55	62
	D <sub>i</sub> (18) <sup>c</sup>	256	273	79	58
	D <sub>i</sub> (19) <sup>c</sup>	149	189	211	156
	V <sub>o</sub> (18) <sup>e</sup>	1,03	1,00	1,73	1,92
	V <sub>o</sub> (19) <sup>e</sup>	1,36	1,21	1,15	1,33

a) Solución en CDCl<sub>3</sub> expresada en mg/ml.

b) Promedio de los NT<sub>1</sub> (en segundos) de los metilenos y metinos del esqueleto esteroide.

c) 10<sup>9</sup> s<sup>-1</sup>.

d) Rotación homogénea.

e) Kcal/mol.

f) Rotación por saltos entre tres posiciones.

vando notables disminuciones en el  $T_1$  a medida que aumenta el grado de hidroxilación, hallando inclusive diferencias entre el 12-hidroxiderivado (155) y el 7-hidroxilado (154) debido a que en este último el hidroxilo se encuentra más expuesto y, por lo tanto, produce un mayor efecto en la movilidad.

Existen notables diferencias en los valores calculados según se considere la rotación de los metilos como un movimiento de saltos (II) ó continuado (I). Sin embargo, en cuanto a su utilidad comparativa, ambos llevaron a las mismas conclusiones:

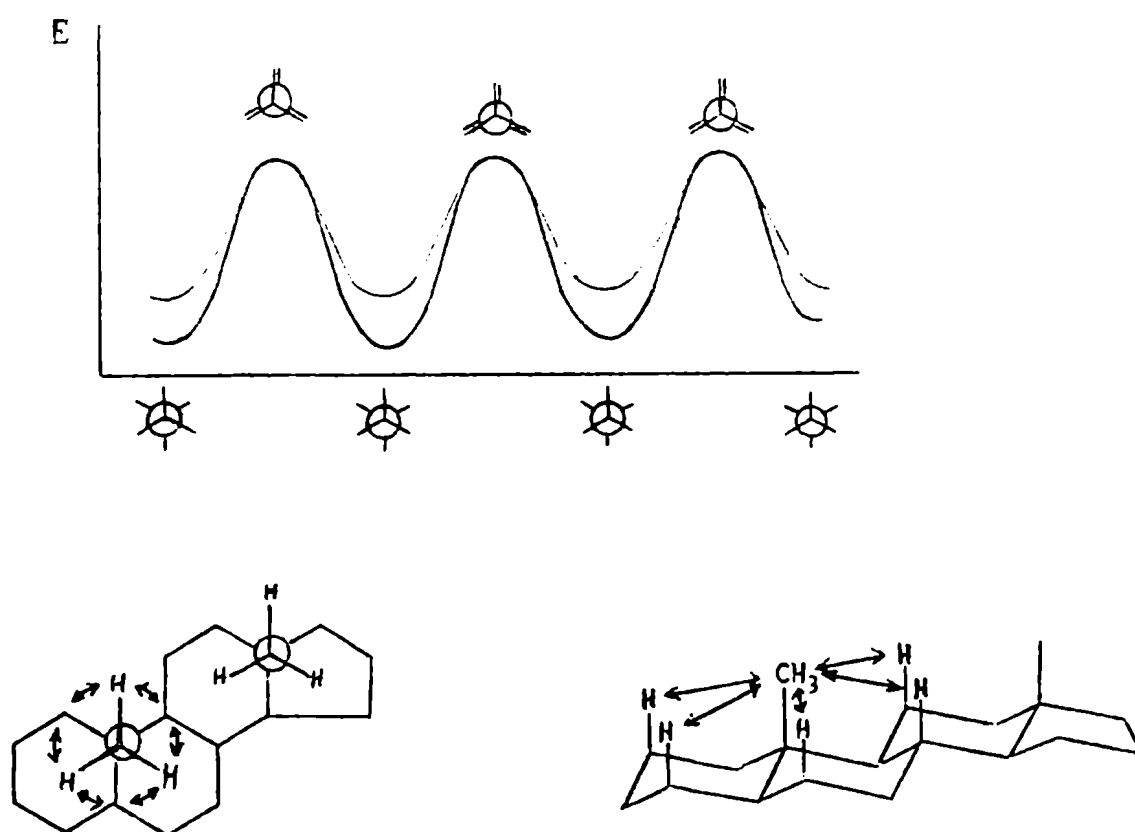
- La introducción de un hidroxilo en posición  $11\beta$  no afectó la barrera de rotación del metilo 19.
- En el caso del metilo 18 la barrera de rotación aumentó notablemente con la hidroxilación mencionada.

Un estudio a priori de la situación, suponiendo que no se produce ninguna distorsión molecular con la introducción del hidroxilo en posición  $11\beta$ , indicaría lo contrario, es decir que se esperaba que las barreras de rotación disminuyeran.

La barrera de rotación corresponde a la diferencia de energía entre las conformaciones alternadas y las eclipsadas <sup>110</sup>. Esta explicación es más coherente con la rotación de saltos (II) que con la continua (I). La energía de las formas eclipsadas depende de la interacción de los hidrógenos del metilo con los sustituyentes del carbono vecino, con los cuales se eclipsan. En el caso de los metilos 18 y 19 esteroïdales dichos sustituyentes correspon

den a carbonos del esqueleto (figura 73).

En cambio la energía de las formas alternadas depende de interacciones a larga distancia entre los metilos y aquellos grupos que se encuentren en relación 1,3-diaxial con el mismo. Por ejemplo en el caso del metilo 19 del androstano las interacciones se producen con los hidrógenos de posiciones  $2\beta$ ,  $4\beta$ ,  $6\beta$ , 8 y  $11\beta$  (figura 73).



**Figura 73:** Interacciones espaciales de los metilos angulares y diagramas de energía que determinan (ejemplificado para el androstano).

La eliminación de alguno de dichos hidrógenos (por ejemplo por introducción de un doble enlace) disminuye las interacciones a larga distancia, estabilizando las formas alternadas. Como consecuencia aumenta la barrera de rotación y, por lo tanto, disminuye la velocidad de rotación <sup>110</sup>.

En cambio si se reemplaza uno de los hidrógenos mencionados por un grupo más voluminoso (por ejemplo un hidroxilo) suponiendo que no se producen modificaciones conformacionales, aumenta la interacción 1,3-diaxial y, por lo tanto, aumenta la energía de las formas alternadas, disminuyendo la barrera de rotación <sup>110</sup>.

A diferencia de lo que cabría esperarse intuitivamente, resulta entonces que el aumento de interacciones con el metilo, aumenta la velocidad de rotación del mismo, ya que disminuye la barrera de rotación.

Por lo tanto, era de esperarse que la introducción de un hidroxilo en posición 11 $\beta$  aumentara la energía de las formas alternadas, disminuyendo las barreras de rotación de los metilos 18 y 19.

Como indica la tabla III-22 la realidad no es así.

La introducción de un hidroxilo en posición 11 $\beta$  no afectó la rotación del metilo 19. Esto indicaría que estos grupos se encuentran suficientemente alejados como para no interactuar, o que el esteroide modificó su conformación tal que la interacción metilo-hidroxilo resultó igual a la interacción metilo-H11 $\beta$  en la conformación original (se compensaría el aumento de tamaño del sustituyente con un aumento en la distancia).

ApSimon y colaboradores <sup>110</sup> determinaron que la presencia de un carbonilo en posición 11 no afecta la rotación del meti

lo 19 (en androstanos). Por lo tanto el H11 $\beta$  no interactuaría con el metilo, ya que su eliminación no modificó su rotación.

Esta observación sugiere que el hidroxilo 11 $\beta$  en corticosterona (6) se encontraría suficientemente alejado del metilo 19 como para que no se produzca interacción entre ellos, no brindando ninguna información acerca de una posible distorsión conformacional debida a la funcionalización, ya que no es posible saber si el hidroxilo 11 $\beta$  se encuentra más alejado en 5 que el H11 $\beta$  correspondiente en el caso de su 11-desoxiderivado (4) respecto del metilo 19, o si la distancia entre este último y el metilo ya era suficiente para que no se produzca la interacción metilo-hidroxilo.

En cuanto al metilo 18, la situación resultó aún más compleja ya que la introducción del hidroxilo 11 $\beta$  produjo un aumento notable en su barrera de rotación.

ApSimon y colaboradores <sup>110</sup> informaron que el metilo 18 en el 11-cetoandrostando gira más lentamente que en el androstando. Esto se debería a la eliminación de la interacción entre el metilo y el H11 $\beta$ , estabilizando las formas alternadas y por consiguiente aumentando la barrera de rotación. Por lo tanto el H11 $\beta$  se encontraría suficientemente cerca del metilo 18 como para interactuar con el mismo.

De no producirse cambios conformacionales, la introducción de un hidroxilo en posición 11 $\beta$  debería aumentar la interacción con el metilo, disminuyendo la barrera de rotación.

Sin embargo se observó lo contrario, es decir un aumento de la barrera de rotación. Una posible explicación sería que la introducción del hidroxilo 11 $\beta$  produciría un cambio conformacional de

modo tal que el metilo se aleje del hidroxilo hasta no interactuar más, o al menos, interactuar menos que con el hidrógeno que se reemplazó.

Por lo tanto el método de Woessner aplicado a 4 y 6 confirmó la distorsión del esteroide en la región de los anillos C y D ya apreciada en el análisis del efecto de la introducción del hidroxilo  $11\beta$  en el  $\delta$  de los carbonos que poseen hidrógenos  $\alpha$ -axiales (pág. 240). En cambio no fue posible confirmar otro tanto respecto de la región de los anillos A y B.

La aplicación del método de Woessner al caso de los corticoides 11-desoxicorticosterona (4) y corticosterona (6) demostró la utilidad del método en el análisis comparativo de la conformación relativa de estos esteroides, abriendo una interesante alternativa para el estudio conformacional de esteroides en solución y su aplicación a estudios estructurales.

Para estos estudios comparativos de corticosterona (6) y su 11-desoxiderivado (4) no fue posible utilizar los datos de rayos X de los mismos <sup>81,140</sup> debido a la existencia de fuertes interacciones intermoleculares en el cristal (fuerzas de van der Waals y puente de hidrógeno OH $11\beta$ -O3 en 6), las cuales impiden suponer que las conformaciones obtenidas por cristalografía sean las existentes en solución. De allí la importancia de los estudios conformacionales por RMN-<sup>13</sup>C, los cuales brindan información sobre el estado molecular en solución, asemejándose más a la situación biológica que se estudia.

CAPITULO IV  
ACTIVIDAD GLUCCORTICOIDE  
DE DERIVADOS DE PROGESTERONA



## ACTIVIDAD GLUCOCORTICOIDE DE DERIVADOS DE PROGESTERONA

Como se discutiera en la introducción de esta tesis, se eligieron como parámetros biológicos de actividad glucocorticoide la inhibición de síntesis de ácido ribonucleico (ARN) y posterior (al menos cronologicamente) lisis celular en timocitos de rata.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en cuanto a la actividad de los derivados mono, di y trihidroxilados en posiciones  $11\beta$ ,  $17\alpha$  y/o 21 de progesterona (1) y sus  $\Delta^1$ -derivados.

En el caso particular de uno de dichos esteroides ( $11\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10)) fue menester analizar el mecanismo por el cual ejerce su acción, debido al particular comportamiento del mismo.

Para un análisis ordenado de los distintos aspectos de la actividad glucocorticoide estudiados fue necesario dividir este capítulo en los siguientes puntos:

- Inhibición de la síntesis de ARN (IV.1.).
- Lisis celular (IV.2.).
- Mecanismo de acción de  $11\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10) (IV.3.).

#### IV.1. Inhibición de la síntesis de ARN.

##### GENERALIDADES:

Para el estudio de este clásico parámetro glucocorticoi de se decidió apartarse algo del criterio general, con el objeto de obtener una visión más detallada del comportamiento de los estroides analizados.

En general se considera que la potencia de un compuesto es máxima cuanto menor es la cantidad del mismo necesaria para producir un efecto observable. Es decir, se asocia sensibilidad con potencia, a punto tal que ninguno de los estudios acerca de la relación estructura-actividad anteriormente realizados ensayaron con concentraciones crecientes de esteroides. Sin embargo se pierde así información tanto acerca del máximo efecto de cada esteroide como acerca de la posibilidad de mecanismos múltiples dependientes de la concentración esteroideal.

En el presente estudio se analizó el comportamiento esteroidal en función de la concentración, desde valores "fisiológicos" hasta aquellos limitados por la solubilidad ( $10^{-4}$  M) <sup>8</sup>.

##### RESULTADOS Y DISCUSION:

Salvo en el caso de  $11\beta,17\alpha,21$ -trihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (16)(ver estructuras correspondientes en figura 1, pág. 4 ), se obtuvieron resultados reproducibles a lo largo de toda la serie de esteroides analizados a todas las concentraciones ensayadas.

La respuesta celular frente a 16 a las distintas concentraciones ensayadas, evidenció una gran dispersión entre experimentos, como puede verse en la figura 74.

Esta diferencia puede explicarse teniendo en cuenta la existencia de poblaciones celulares sensibles y resistentes a los esteroides en el timo <sup>5</sup>. En el gráfico de la figura 74 pueden observarse dos curvas perfectamente definidas. La superior corresponde a poblaciones notablemente sensibles al corticoide, las cuales respondieron al mismo a concentraciones tan bajas como  $10^{-9}$  M. En cambio las otras poblaciones recién respondieron a 16 a concentraciones de  $10^{-7}$  M, llegando a un efecto máximo del 28 % de inhibición para  $10^{-4}$  M, frente a un 54 % en las primeras. En los experimentos realizados a concentraciones  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  M aparentemente siempre se trabajó con poblaciones sensibles.

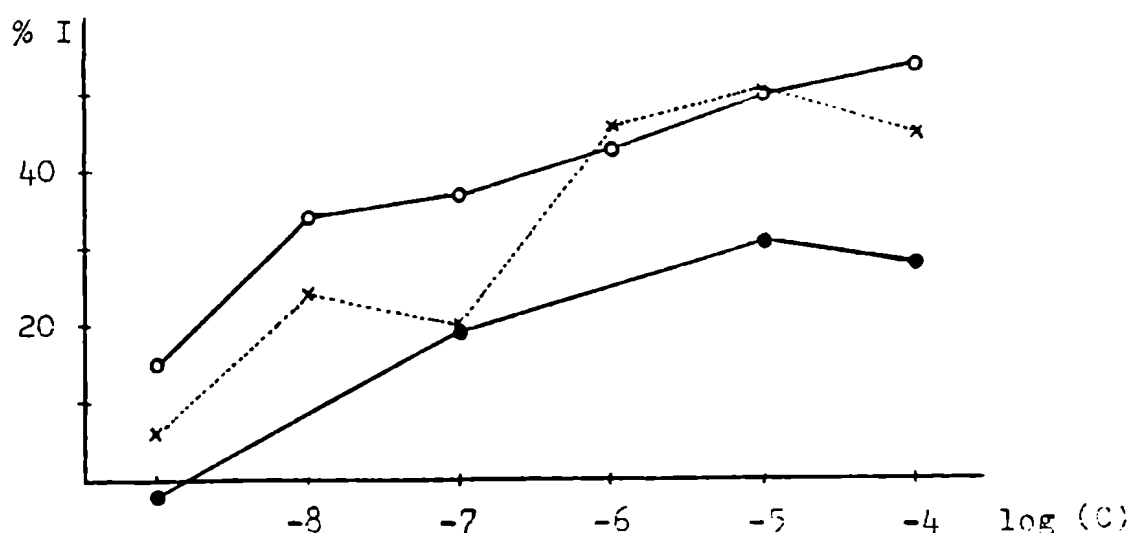


Figura 74: Curvas dosis-respuesta (inhibición de incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN) para cortisol (8) (—x—) y su  $\Delta^1$ -derivado (16) (sobre poblaciones sensibles (—o—) y resistentes (—●—)).

A pesar del comportamiento aleatorio observado (según la población de timocitos predominante en cada lote de ratas usado en los experimentos), puede verse la típica forma de la curva del gráfico dosis-respuesta, del tipo de saturación, presentando una concentración de esteroide a partir de la cual la respuesta no se modifica. Este es el tipo de curva que se produce cuando el efecto hormonal está mediado por la unión a un receptor específico, una de cuyas características es su limitada capacidad.

Un inconveniente adicional del análisis del efecto inhibitorio de 16 es que se produjo en algunos casos una considerable lisis celular. Dado que la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina se expresa en función de un número de células ( $10^7$ ) cualquier factor que altere la lisis (y por lo tanto el número de células) afecta el factor divisor de la expresión, contribuyendo en parte a la dispersión observada (aunque no es suficiente para justificar los diferentes comportamientos que aparecieron, ya que experiencias sin lisis mostraron respuestas altas o bajas que denotan la presencia de diferentes poblaciones de timocitos).

La serie de esteroides no pudo ser completada con el esteroide base sin hidroxilar (1) y su  $\Delta^1$ -derivado (9) debido a la lisis celular. En estos casos se produjo una notable reducción en el número de células vivas al cabo de 3 hs de incubación, lo cual invalidó los resultados. En el resto de los casos la viabilidad fue mayor del 90 %, no observándose diferencias significativas entre el número de células tratadas recuperadas y las no tratadas.

La tabla IV-1 resume los resultados obtenidos en cuanto a la inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN (fracción

Tabla IV-1: Inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN en timocitos de rata por preña-4-en-3,20-dionas y preña-1,4-dien-3,20-dionas <sup>a</sup>.

	$10^{-9}$ M	$10^{-8}$ M	$10^{-7}$ M	$5 \times 10^{-7}$ M	$10^{-6}$ M	$10^{-5}$ M	$3 \times 10^{-5}$ M	$8 \times 10^{-5}$ M	$10^{-4}$ M
2	-	-	6±2(13)	-	26±3(21)	31±3(12)	39±5(5)	-	50±2(19)
3	-	-	-	-	-1±4(3)	6±3(6)	-	-	9±4(6)
4	-	-1±4(3)	19±2(10)	-	25±2(8)	30±1(9)	32±1(3)	-	45±2(15)
5	-	-	-	-	19±5(6)	28±2(9)	-	-	37±3(5)
6	-	2±6(3)	22±3(9)	33±3(5)	37±1(48)	40±3(18)	-	-	43±2(7)
7	-	-	-	-	-	1±7(6)	-	-	10±4(12)
8	6±6(6)	24±7(9)	20±3(6)	-	46±2(6)	51±1(6)	-	-	45±5(9)
10	-	-	3±5(6)	-	18±2(10)	24±2(12)	42±4(5)	58±4(3)	66±2(10)
11	-	-	-	-	16±4(9)	9±5(11)	-	-	7±3(14)
12	-	4±4(3)	14±3(5)	-	26±5(2)	31±3(6)	-	-	46±4(10)
13	-	-	-	-	12±5(3)	15±3(6)	-	-	23±3(9)
14	1±7(3)	0±7(3)	22±2(6)	-	37±3(9)	39±2(16)	50±5(3)	-	50±3(11)
15	-	-	-	-	-	6±4(3)	-	-	14±5(9)
16 <sup>b</sup> <sub>S</sub>	15±2(3)	34±6(5)	37±3(3)	-	43±2(6)	50±3(3)	-	-	54±3(6)
16 <sup>c</sup> <sub>R</sub>	-2±2(5)	-	19±6(3)	-	-	31±2(3)	-	-	28±3(10)

a) Ver estructuras correspondientes en figura 1, pág. 4 (- indica estimulación).

b) Correspondería a poblaciones sensibles al esteroide.

c) Correspondería a poblaciones no sensibles (resistentes) al esteroide.

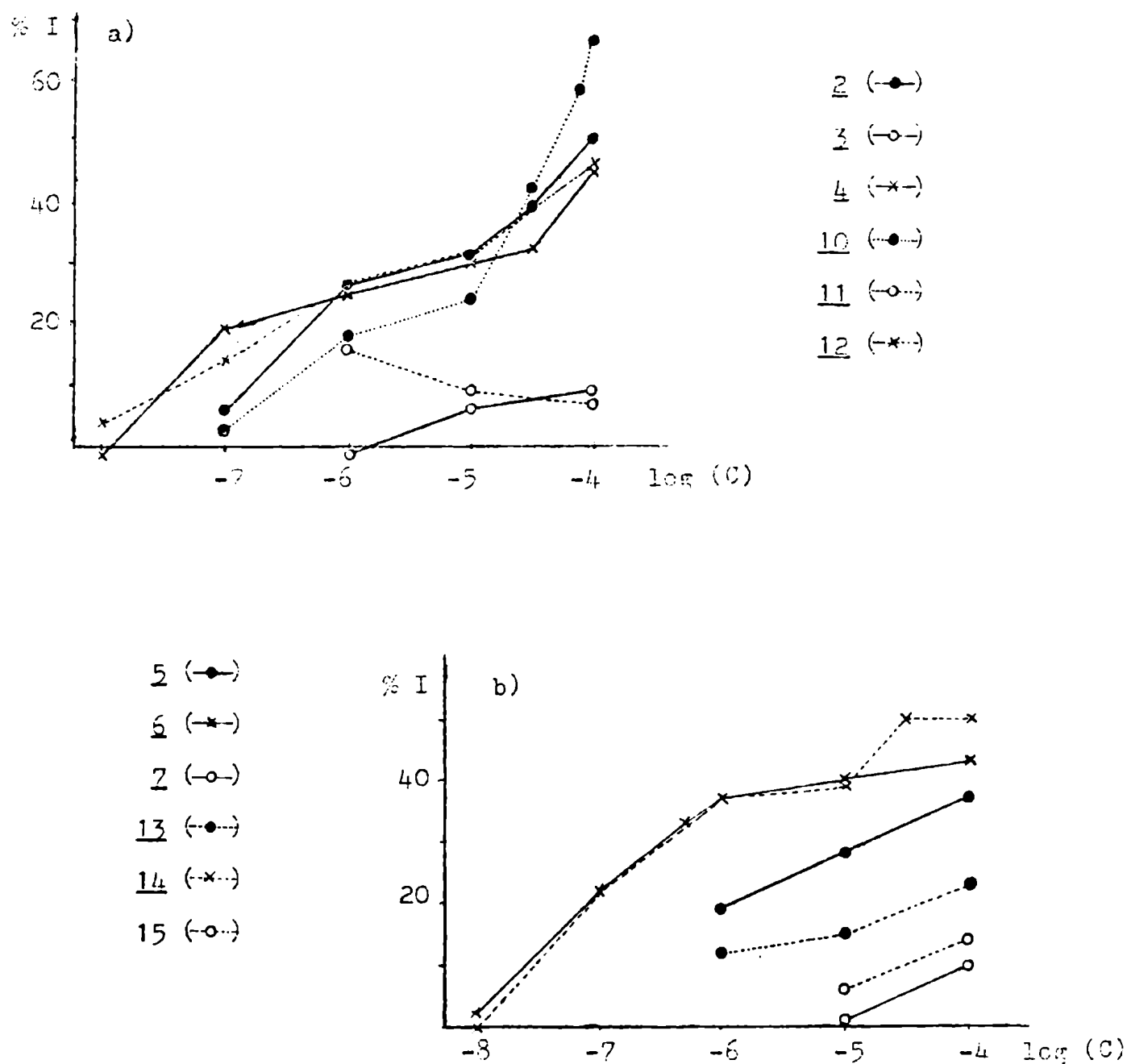
insoluble en ácido perclórico al 5 %) de los distintos esteroides, en las concentraciones ensayadas. Estos valores se refieren al % de inhibición respecto de controles (células incubadas en ausencia de esteroide) luego de 3 hs de incubación. En la tabla se indica también el error standard de cada dato, así como el número de ensayos realizados en cada una de las condiciones indicadas.

Sin embargo, para la observación más detallada del comportamiento individual de los esteroides resulta más conveniente la representación gráfica de los resultados de un sistema inhibición vs log (concentración), como puede verse en las figuras 74 y 75.

Las curvas dosis-respuesta de los glucocorticoides clásicos corticosterona (6) y cortisol (8) y sus  $\Delta^1$ -derivados (14 y 16 respectivamente), presentaron la forma característica de las curvas de saturación, es decir, que a partir de cierta concentración el efecto no se modifica, arribándose a un "plateau".

En el caso de 14 su efecto resultó igual al de su 1,2 dihidro derivado (6) hasta la concentración de  $10^{-5}$  M (al plateau se arribó a una concentración de esteroide de  $10^{-6}$  M). A concentraciones superiores el  $\Delta^1$ -esteroide se diferenció de 6 produciendo una mayor inhibición (significativamente distintos según el test de Student <sup>141</sup> ( $p < 0,05$ )).

Los esteroides de mayor sensibilidad (efecto observable con menor cantidad de esteroide) resultaron los trihidroxiderivados 8 y, especialmente, 16 (este último solo sobre las poblaciones sensibles a su presencia) produciendo inhibición detectable de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina en timocitos de rata a concentraciones entre  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  M. En cambio el glucocorticoide natural de la rata,



**Figura 75:** Curvas dosis-respuesta (inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN) de (a) mono y (b) dihidroxi-progesteronas (ver estructuras en figura 1, pág. 4).

corticosterona (6), y su  $\Delta^1$ -derivado 14, requirieron concentraciones superiores a  $10^{-8}$  M para producir un efecto inhibitorio significativo.

Estrictamente hablando cuando se indica mayor o menor sensibilidad esteroideal en realidad se trata de mayor o menor sensibilidad de la célula (timocito) frente a un determinado esteroide.

En cuanto al otro extremo de la curva dosis-respuesta los dos glucocorticoides naturales (6 y 8) y sus  $\Delta^1$ -derivados (14 y 16) produjeron un efecto máximo dentro del rango 43-54 % (16 en el caso de poblaciones sensibles).

A valores similares de inhibición arribaron los monohidroxisteroides 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (2), 11-desoxicorticosterona (4) y el  $\Delta^1$ -derivado de este último (12). Estos tres esteroides presentaron una curva dosis-respuesta similar (figura 75a) que aparentemente llega a un plateau de aproximadamente el 30 % de inhibición a una concentración de  $10^{-5}$  M. Sin embargo a concentraciones superiores se produjo un aumento brusco de dicho efecto, arribando a los valores indicados, similares a los de los corticoides clásicos.

En cuanto a la sensibilidad de estos compuestos, 4 y 12 produjeron efectos observables a concentraciones similares a la de 6. En cambio 2 resultó un orden de magnitud menos sensible que los anteriores.

El  $\Delta^1$ -derivado de este último esteroide resultó menos sensible y activo aún, hasta una concentración de  $10^{-5}$  M donde aparentemente arribar a un plateau. Sin embargo, a concentraciones superiores produjo un aumento brusco que superó el efecto inhibitorio de todos los otros esteroides analizados (66 % inhibición a  $10^{-4}$  M)(figura 75).



Por lo tanto, a concentraciones relativamente bajas (por debajo de  $10^{-5}$  M) los esteroides 2, 4, 6, 8 y sus  $\Delta^1$ -derivados 10, 12, 14 y 16 produjeron curvas dosis-respuesta de tipo de saturación como era de esperarse en compuestos que producen su acción a través de la unión a un receptor específico (ver IV.3., pág. 293). Una de las características del receptor es precisamente su baja capacidad, causante de la limitación en cuanto al incremento del efecto observado a medida que crece la concentración esteroideal.

Sin embargo, este comportamiento "ideal" de todos los esteroides mencionados, solo se produjo hasta una concentración de  $10^{-5}$  M. Más allá de la misma, los monohidroxiderivados 2, 4, 12 y especialmente  $\Delta^1$ - $11\beta$ -hidroxiprogesterona (10), produjeron incrementos injustificables según el mecanismo clásico.

En el caso de los  $11\beta$ -hidroxiesteroides 2 y 10 se hicieron algunos ensayos a concentraciones algo superiores a  $10^{-4}$  M que indicaron que el efecto inhibitorio continuaba incrementándose. Estos resultados presentaron una considerable dispersión de datos de un experimento a otro, probablemente debido a dificultades en la solubilización de los esteroides, ya que en esas condiciones se está trabajando muy cerca de la saturación y con masas muy pequeñas (inferiores a  $500\text{ }\mu\text{g}$ ) que no permiten verificar visualmente si quedan restos de compuesto sin disolver. Sin embargo en todos los casos se observaron efectos inhibitorios notablemente superiores a los observados a  $10^{-4}$  M, llegando a inhibiciones del 80-90 %.

Por lo tanto se estaría frente a un efecto no saturable, es decir que continuaría incrementándose "indefinidamente" con la concentración, limitado solo por el efecto en si (evidentemente no

es posible una inhibición superior al 100 %).

El efecto inhibitorio a altas concentraciones ( $10^{-4}$  M) producido por 10 fue analizado en cuanto al mecanismo a través del cual se produce, lo cual será discutido en detalle en IV.3. (pág. 293).

En la figura 75 y la tabla IV-1 puede observarse que los esteroides 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3), cortexolona (2) y sus  $\Delta^1$ -derivados (11 y 15 respectivamente) no afectaron mayormente la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a la fracción celular insoluble en ácido perclórico 5 %, aún a  $10^{-4}$  M. Los diferentes experimentos presentaron en estos casos una mayor dispersión de datos (lo que se traduce en un mayor error estándar) característico justamente de la no existencia de un neto efecto inhibitorio. Cabe destacar que con testosterona ( $10^{-4}$  M), considerada como un esteroide que no produce efecto en la síntesis de ARN en timocitos, se observó una inhibición del 19 %, también con considerable dispersión de datos, considerado como no específico. Por lo tanto el efecto de 3, 2, 11 y 15 puede considerarse no específico <sup>142</sup>.

Finalmente 21-desoxicortisol (5) y su  $\Delta^1$ -derivado (13) presentaron la particularidad de ser el único par en el cual el dieno resultó significativamente menos activo que el  $\Delta^4$ -3-cetosteroide correspondiente, a lo largo de toda la curva dosis-respuesta. (figura 75). 13 presentó un efecto inhibitorio muy pequeño, lindando con los valores considerados de no efecto (inespecífico) aunque menos disperso que éstos. En cambio 5 presentó una actividad similar a la de 10 a concentraciones de  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M, aunque más allá de esas concentraciones el esteroide dihidroxilado mantuvo el rit

mo de aumento del efecto inhibitorio, mientras que el de 10 se incrementó notablemente. El efecto de 5 a  $10^{-4}$  M (37 y 40) resultó algo menor que el del resto de los esteroides que presentan acción sobre el timocito (43-54 a salvo 10 que produjo un 66 % de inhibición).

Con los datos disponibles no es posible indicar si el tipo de curva observada en 5 y 13 es del tipo de saturación, debido al pequeño rango de concentración analizado.

Es posible dividir los mono, di y trihidroxi-esteroides analizados, en dos grandes grupos:

- Uno formado por 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3), cortexolona (2) y sus  $\Delta^1$ -derivados (11 y 15) que no presentaron actividad inhibitoria en el rango de concentraciones analizado. 2 es conocido en literatura por su actividad antagónica competitiva de los glucocorticoides <sup>143</sup>.
- El otro grupo, formado por el resto de los esteroides analizados; aquellos que produjeron, en mayor o menor medida, algún efecto inhibitorio sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-uridina a ARN en timocitos.

Este segundo grupo puede ser clasificado según distintos criterios, para su posterior relación con las características estructurales propias (funcionales y conformacionales):

- Una forma de ordenarlos sería la clásica, como se indicara anteriormente, en base a la sensibilidad esteroideal. La clasificación resultante sería:

$$(\underline{16}) > (\underline{3}) > (\underline{6}), (\underline{14}) \geq (\underline{4}), (\underline{12}) > (\underline{2}) > (\underline{5}), (\underline{10}) > (\underline{13})$$

(ver estructuras correspondientes en la figura 1, pág. 4 ó sus nombres en el texto que precede este ordenamiento). 16 se refiere a la respuesta de poblaciones sensibles frente al esteroide. El  $\geq$  se refiere a que 6 y 14 resultan levemente más sensibles que 4 y 12.

- Otro posible ordenamiento sería el de actividad a la mayor concentración ~~analizada~~. Entonces la clasificación sería:

$$(\underline{10}) > (\underline{16}), (\underline{14}), (\underline{2}), (\underline{12}), (\underline{8}), (\underline{4}), (\underline{6}) \geq (\underline{5}) > (\underline{13})$$

Este ordenamiento presenta un inconveniente muy importante en cuanto a su correlación con características estructurales ya que a esa concentración coexistirían dos mecanismos distintos, los cuales no necesariamente deberían tener los mismos requerimientos estructurales.

- Finalmente existe una tercera posibilidad que pretende obtener una visión del máximo efecto que puede producirse a través del mecanismo saturable. Para ello se analizó el efecto inhibitorio de los esteroides a una concentración de  $10^{-5}$  M, a partir de la cual recién se observó la acción posiblemente no mediada por este mecanismo saturable, o sea no mediado por la unión a un receptor (ver IV.3., pág. 293). La clasificación sería entonces:

$$(\underline{8}), (\underline{16}) > (\underline{6}), (\underline{14}) > (\underline{2}), (\underline{12}), (\underline{4}), (\underline{5}) > (\underline{10}) > (\underline{13})$$

En el capítulo V se analizan estas clasificaciones y la presencia, en algunos casos de un mecanismo alternativo a concentraciones relativamente altas, a la luz de la información estructural obtenida por espectrometría de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ , detallada en el capítulo III, y de la funcionalidad de los esteroides.

## IV.2. Lisis celular.

### GENERALIDADES:

El efecto último de un glucocorticoide sobre las células de timo es la ruptura de las mismas a través de una secuencia de eventos poco conocida.

Los primeros estudios acerca de los efectos catabólico-lítico <sup>142-148</sup> llevados a cabo por los grupos de Munck y Mackman, favorecían la teoría que consideraba a la inhibición de la entrada a la célula de nutrientes y precursores simples como mediador universal entre el glucocorticoide y todas las otras acciones inhibitorias y líticas observadas.

Pese a que Gelehrter y colaboradores <sup>149</sup> pudieron dissociar distintos efectos glucocorticoides en hepatoma de rata, el mecanismo generalmente aceptado <sup>144,150,151</sup> presenta los siguientes pasos:

- Unión a un receptor citosólico específico y traslocación al núcleo.
- Inducción de la síntesis de una proteína específica ("proteína asesina").
- Inhibición por esa proteína de la síntesis de ARN y de proteínas.
- Lisis celular.

Este mecanismo será discutido en mayor detalle en IV.3. (pág. 293).

Para verificar si realmente se cumple esta secuencia de eventos en los esteroides analizados en cuanto a su efecto inhibitorio, se decidió estudiar el efecto lítico de los mismos.

Para ello se eligió inicialmente la mayor concentración utilizada anteriormente ( $10^{-4}$  M), intentándose ver así si se producían diferencias entre aquellos esteroides que presentaban curvas dosis-respuesta del tipo de saturación (por ejemplo corticosterona (6)) y aquellos que se apartaban de dicho comportamiento a altas concentraciones (especialmente  $\Delta^1$ -11 $\beta$ -hidroxi-progesterona (10)). También se analizó el efecto de algunos esteroides a menores concentraciones.

#### RESULTADOS Y DISCUSION:

Originalmente se analizó la lisis al cabo de 8 hs, extendiéndose el período luego a 16 hs con el fin de incrementar el efecto observado. Se obtuvo así una mejor diferenciación en el grado de acción de los distintos esteroides. Los resultados se resumen en la tabla IV-2. Cabe destacar que se considera aquí como lisis al valor calculado como  $100 - \%V$  siendo  $\%V$  el porcentaje de células vivas respecto del control, incubado este en ausencia de esteroide. Por lo tanto, estrictamente los porcentajes que se presentan y analizan no corresponden a la lisis celular sino a la muerte celular (estén o no lisadas).

Como puede verse en la tabla IV-2, los glucocorticoides naturales (corticosterona (6) y cortisol (8)), así como sus  $\Delta^1$ -de

Tabla IV-2: Acción lítica (disminución de la viabilidad celular) de pregn-4-en-3,20-dionas (2-8) y pregna-1,4-dien-3,20-dionas (10-16) a,b.

	$10^{-4}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-6}$ M	$10^{-7}$ M
<u>2</u>	3±8 (17)	61±1 (6)	45±5 (6)	36±3 (6)
<u>3</u>	5±4 (6)	-	-	-
<u>4</u>	50±2 (12)	-	-	-
<u>5</u>	59±3 (4)	-	-	-
<u>6</u>	70±1 (6)	67±3 (5)	32±2 (3)	-
<u>7</u>	38±6 (7)	-	-	-
<u>8</u>	69±2 (6)	78±3 (3)	-	-
<u>10</u>	-7±7 (17)	45±6 (6)	36±1 (9)	21±3 (6)
<u>11</u>	8±6 (6)	-	-	-
<u>12</u>	49±1 (12)	-	-	-
<u>13</u>	58±2 (4)	-	-	-
<u>14</u>	66±2 (6)	60±1 (2)	-	-
<u>15</u>	38±7 (7)	-	-	-
<u>16</u>	72±2 (6)	78±3 (6)	-	-

a) Ver estructuras correspondientes en figura 1, pág. 4.

b) 100 - % células vivas respecto de controles. Entre paréntesis se indica el número de casos.



rivados (14 y 15 respectivamente) produjeron una muy importante disminución en el número de células vivas (aproximadamente del 70 %).

A concentraciones un orden de magnitud inferior también se observó un importante efecto lítico de los mismos.

En el caso de los trihidroxiesteroides (8 y 16) se produjo un mayor efecto lítico a  $10^{-5}$  M que a la concentración máxima ensayada. Dichos resultados provienen de una sola experiencia (por triplicado) que arrojó valores particularmente elevados. En ese caso se incubaron células con 16  $10^{-4}$  M el cual también produjo un 78 % de lisis (igual que las incubaciones realizadas con los trihidroxiesteroides a una concentración de  $10^{-5}$  M). Por lo tanto, dicho efecto mayor a  $10^{-5}$  M probablemente no sea real sino producto de un experimento con resultados elevados, lo cual es admisible dentro de la variabilidad del sistema biológico (en particular en 16).

En el caso de 6 se realizaron incubaciones donde este esteroide se hallaba presente a una concentración de  $10^{-6}$  M, observándose lisis también a esa concentración.

Fisiologicamente en la rata, el glucocorticoide circulante (6), liberado por las glándulas adrenales, es el que produce la regulación del tamaño del timo. Cuando se produce la adrenalectomía del animal, el timo crece debido a la proliferación celular, especialmente de timocitos sensibles al esteroide. Esa es una de las razones por las cuales se trabajó en estos estudios con timos de ratas adrenalectomizadas (mayor tamaño del órgano y mayor número de timocitos sensibles). La otra razón es que mediante la eliminación de la glándula productora de glucocorticoides, se asegura que cualquier efecto observado se debe al esteroide ensayado y no a la

existencia de hormona endógena.

Continuando el análisis de la acción lítica, la tabla IV-2 indica que los esteroides  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) y su  $\Delta^1$ -derivado (11) que no produjeron inhibición en la síntesis de ARN, tampoco causaron disminución en el número de células vivas.

En cambio los esteroides cortexolona (7) y su  $\Delta^1$ -derivado (15) que tampoco fueron efectivos en la inhibición de la síntesis de ARN, produjeron una apreciable lisis celular. Se planteó así la primera discrepancia con el mecanismo secuencial propuesto ya que se observó lisis celular sin que se produjera la inhibición previa de la síntesis de ARN, supuesta causante de la disminución en el número de células vivas.

$11$ -desoxicorticosterona (4) y su  $\Delta^1$ -derivado (12) que produjeron a una concentración de  $10^{-4}$  M un efecto inhibitorio similar al de 6 a esa concentración, resultaron considerablemente menos efectivos en cuanto a la lisis celular.

En cambio  $21$ -desoxicortisol (5) y su  $\Delta^1$ -derivado (13), menos activos que los monohidroxiesteroides anteriores, especialmente el segundo, como inhibidores de la síntesis de ARN, produjeron mayor lisis que 4, aunque algo menor que el glucocorticoide 6. Nuevamente aquí se encontraron evidencias que apuntan en contra del mecanismo secuencial propuesto.

Finalmente, el caso más interesante fue el de  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2) y su  $\Delta^1$ -derivado (10). Estos esteroides sumamen

te efectivos en cuanto a la inhibición de la síntesis de ARN, no produjeron lisis celular en absoluto. En algunas experiencias se observó inclusive mayor número de células en las incubaciones realizadas en presencia de esteroide que en los controles. Esto se opone totalmente a lo esperado teniendo en cuenta el mecanismo secuencial indicado anteriormente.

Justamente estos esteroides presentaron un comportamiento particular a altas concentraciones en cuanto al efecto inhibitorio, dando lugar a curvas dosis-respuesta de no saturación.

Para verificar si la disociación de efectos (inhibitorio-lítico) era propio de este par de esteroides a lo largo de todo el rango de concentración o solo se producía a altas concentraciones, en concordancia con el anormal efecto inhibitorio, se decidió analizar la lisis celular en función de la concentración de 2 y 10. Los resultados se presentan en la tabla IV-2, así como en la figura 76 donde también se representó gráficamente el efecto inhibitorio con fines comparativos.

Resultó sorprendente que a una concentración de  $10^{-7}$  M, donde el efecto inhibitorio fue mínimo, se produjo una significativa disminución en el número de células vivas, siendo más activo 2 que su  $\Delta^1$ -derivado (10).

Un aumento en la concentración ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M) produjo el incremento en ambos efectos inhibitorio y lítico, de acuerdo con la secuencia de eventos que desencadenaría teóricamente la lisis celular. En cambio un posterior aumento en la concentración de los esteroides, que en el caso del efecto inhibitorio produjo un brusco aumento, disminuyó la lisis, la cual desapareció totalmente a

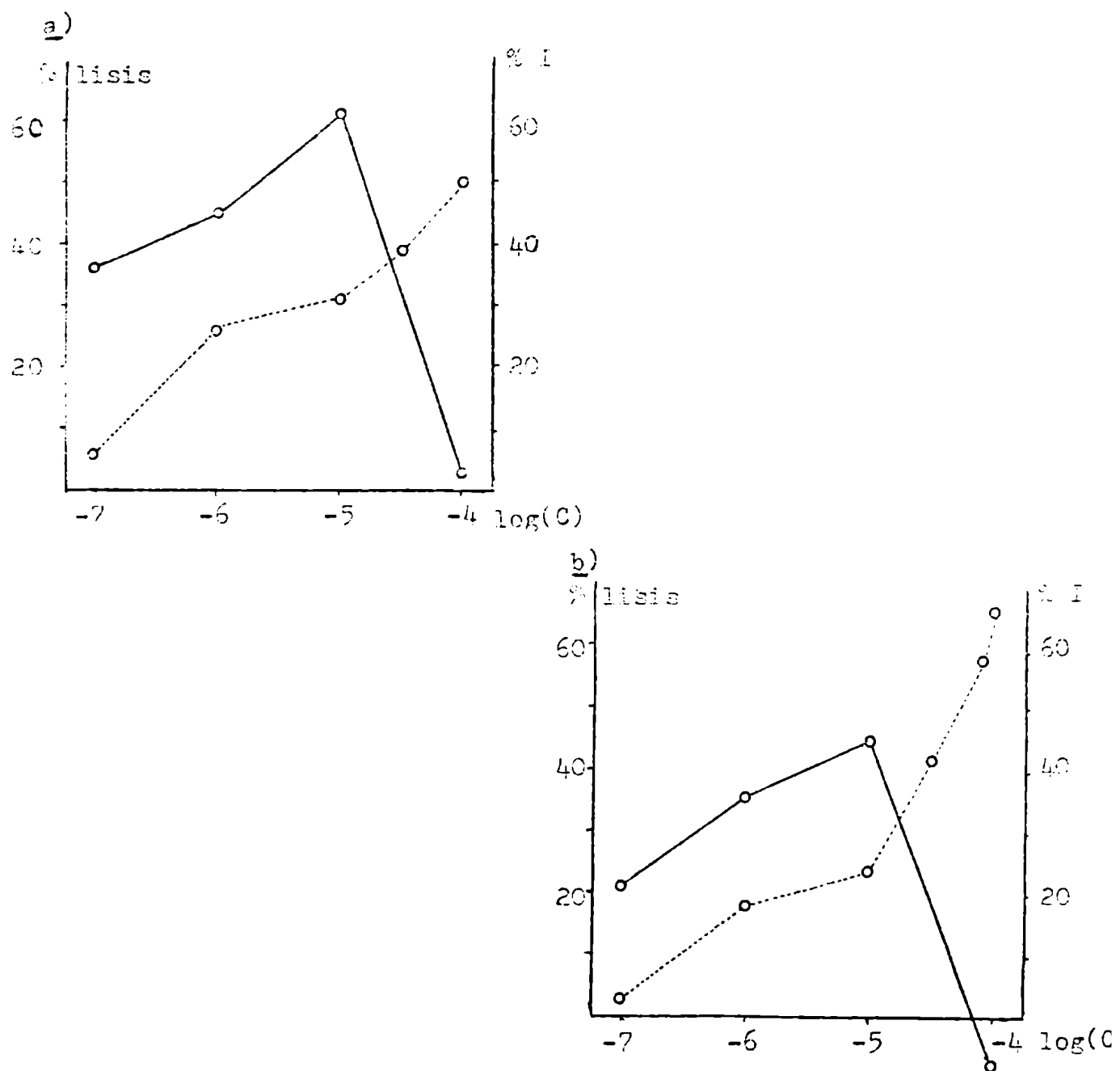


Figura 76: Curvas dosis-respuesta (inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina (----) y lisis celular (—)) para (a)  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2) y (b)  $\Delta^1$ - $11\beta$ -hidroxiprogesterona (10).

$10^{-4}$  M como se indicó anteriormente.

Nuevamente se presentaron dos comportamientos distintos para 2 y 10 según la concentración esteroideal. A concentraciones inferiores a  $10^{-5}$  M los esteroides siguieron aparentemente un comportamiento "clásico" dando lugar a una curva dosis-respuesta del tipo de saturación para la inhibición de síntesis de ARN, siendo más activo 2 que 10. Concomitantemente con ese aumento del efecto inhibitorio se produjo un aumento en la lisis celular al cabo de 16 hs de incubación (la inhibición se observa a las 3 hs de incubación, es decir que precede, al menos temporalmente, a la lisis).

En cambio a mayores concentraciones, donde los esteroides incrementaron bruscamente su efecto inhibitorio, apartándose del comportamiento de saturación, se produjo la desaparición total de la acción lítica.

La menor eficacia de los esteroides 4 y 12 a la máxima concentración ensayada ( $10^{-4}$  M) en cuanto a la lisis, a pesar de producir una inhibición de la síntesis de ARN similar a la de los glucocorticoides naturales 6 y 8, podría radicar en que los 21-monohidroxiesteroides también se apartarían del comportamiento saturable a concentraciones superiores a  $10^{-5}$  M, en forma similar a 2 (ver figura 75, pág. 277).

Antes de ahondar en estos hechos para intentar una explicación, es necesario conocer lo mejor posible el mecanismo por el cual se producen los efectos indicados. Esto fue realizado especialmente en el caso de 10, lo cual será discutido en el siguiente punto de este capítulo.

Finalmente, en cuanto al efecto lítico de los esteroides analizados, puede verse que no existieron diferencias significativas entre el efecto de un esteroide y el de su  $\Delta^1$ -derivado a la concentración analizada. Este hecho produjo una nueva discrepancia con el efecto inhibitorio, en el cual existieron diferencias significativas entre los pares:  $10 > 2$ ,  $5 > 13$ ,  $14 > 6$  y  $16_s > 8 > 16_r$ , donde  $16_{s,r}$  se refiere al efecto de  $16$  sobre poblaciones sensibles y resistentes al esteroide.

En cuanto a las poblaciones sensibles y resistentes frente a  $16$ , que produjeron diferencias muy grandes en la respuesta inhibitoria sobre la síntesis de ARN, creó cierta dispersión en el efecto lítico, aunque no en la proporción observada anteriormente, pudiéndose considerar como una respuesta única (sin embargo no puede descartarse que en los tres experimentos realizados se haya trabajado por azar siempre con poblaciones particularmente sensibles).

El orden según la actividad lítica de los esteroides analizados a la concentración de  $10^{-4}$  M, el cual será comparado con las características estructurales (funcionales y conformacionales) en el capítulo V, sería el siguiente:

$$16, 6, 8, 14 > 5, 13 > 4, 12 > 7, 15 > 11, 3, 2, 10$$

#### IV.3. Mecanismo de acción de $11\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10).

##### GENERALIDADES:

Como se describió en los puntos anteriores varios esteroides, especialmente  $\Delta^1$ - $11\beta$ -hidroxiprogesterona (10), presentaron comportamientos distintos del resto de los compuestos analizados (entre ellos los glucocorticoides naturales corticosterona (6) y cortisol (3)).

En cuanto a la inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN (ver IV.1., pág. 272) presentaron curvas dosis-respuesta de no saturación a altas concentraciones. A concentraciones inferiores a  $10^{-5}$  M el efecto de estos esteroides fue menor que el de los glucocorticoides naturales, mientras que por encima de  $10^{-5}$  M el efecto aumentó notablemente, no presentando el clásico plateau. En cambio el resto de los esteroides analizados presentaron curvas de saturación, es decir, que por encima de cierta concentración el efecto inhibitorio no se modificó.

10 y su 1,2-dihidroderivado (2) no produjeron lisis celular pese a su poderoso efecto inhibitorio, a diferencia del resto de los esteroides que sí causaron una disminución en el número de células vivas, aparentemente correlacionada con el grado de inhibición de síntesis de ARN de las mismas (ver IV.2., pág. 284). En el caso de 11-desoxicorticosterona (4) y su  $\Delta^1$ -derivado (12) el efecto lítico fue apreciable aunque no el esperado de acuerdo con su actividad inhibitoria, pero si teniendo en cuenta que estos es

teroides se comportan en forma similar a 2 en cuanto a la inhibición.

Para realizar un análisis de relación estructura-actividad resulta fundamental conocer si el grupo de esteroides estudiado actúa a través de un mismo mecanismo. De ser así, no existen inconvenientes en correlacionarlos. En cambio si dentro del grupo existe algún esteroide que actúa por otro mecanismo, es necesario sacar a este de la serie que se analiza, ya que el otro mecanismo puede tener otros requerimientos estructurales. Esto último puede llevar a conclusiones erróneas dado que se consideran dos mecanismos distintos, con distintos requerimientos, como uno solo.

El comportamiento "anómalo" de 2 y 10, y en menor medida 4 y 12, podría deberse a que su acción se produce a través de un mecanismo distinto del "clásico", es decir, del generalmente aceptado para los glucocorticoides. Por lo tanto, antes de analizar en profundidad la relación entre los efectos observados y la estructura esteroidal, se decidió verificar si 10 seguía un comportamiento clásico al igual que el resto de los compuestos analizados.

El mecanismo clásico de acción de hormonas esteroides incluye los siguientes pasos <sup>152</sup>:

- Se encuentra generalmente aceptado que el esteroide entra a la célula blanco por simple difusión y que en la célula se une con gran afinidad a un receptor citoplasmático.
- El complejo hormona-receptor se activa y es traslocado al núcleo.



- En el núcleo, el complejo activado se une a sitios colectivos de la cromatina.
- La interacción del complejo hormona-receptor con el genoma da lugar a la modulación de la síntesis de un ARN mensajero específico que codifica proteínas también específicas.
- La síntesis de proteínas especialmente inducidas es la respuesta final de la respuesta fisiológica a la hormona (figura 77).

Apoyan este mecanismo el hecho que la respuesta es saturable, lo cual indica una limitada capacidad del receptor, el he-

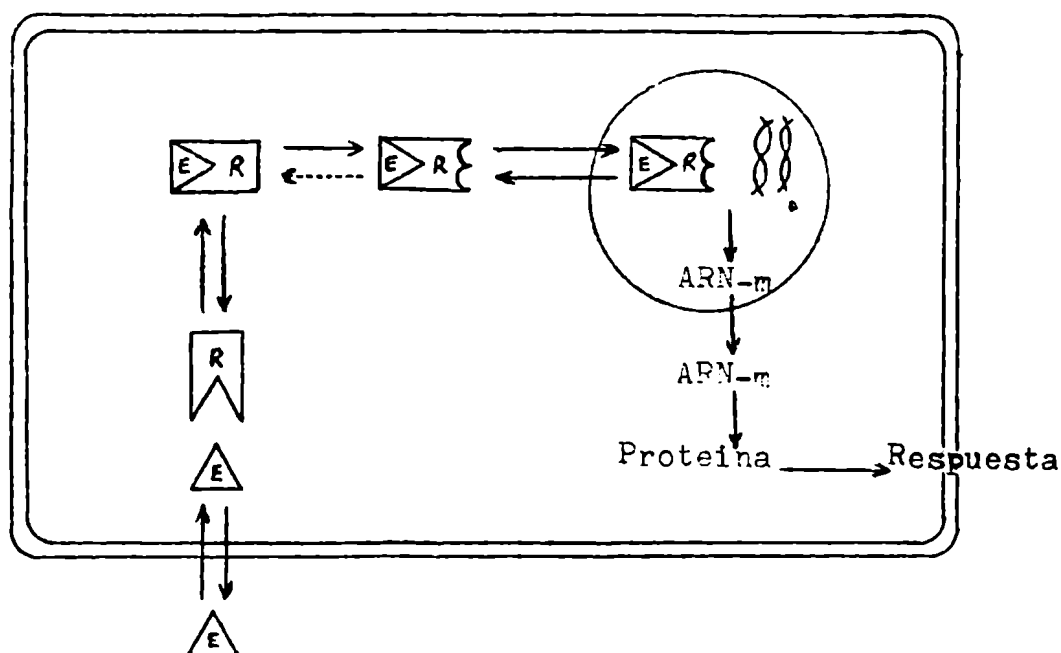


Figura 77: Mecanismo "clásico" de acción de hormonas esteroides (referencia 152).

cho que inhibidores de la interacción del complejo hormona-receptor con el genoma (por ejemplo el fosfato de piridoxal <sup>153</sup>) inhibe también la respuesta, y la desaparición de efectos en presencia de inhibidores de síntesis de ARN y de proteínas <sup>154</sup>.

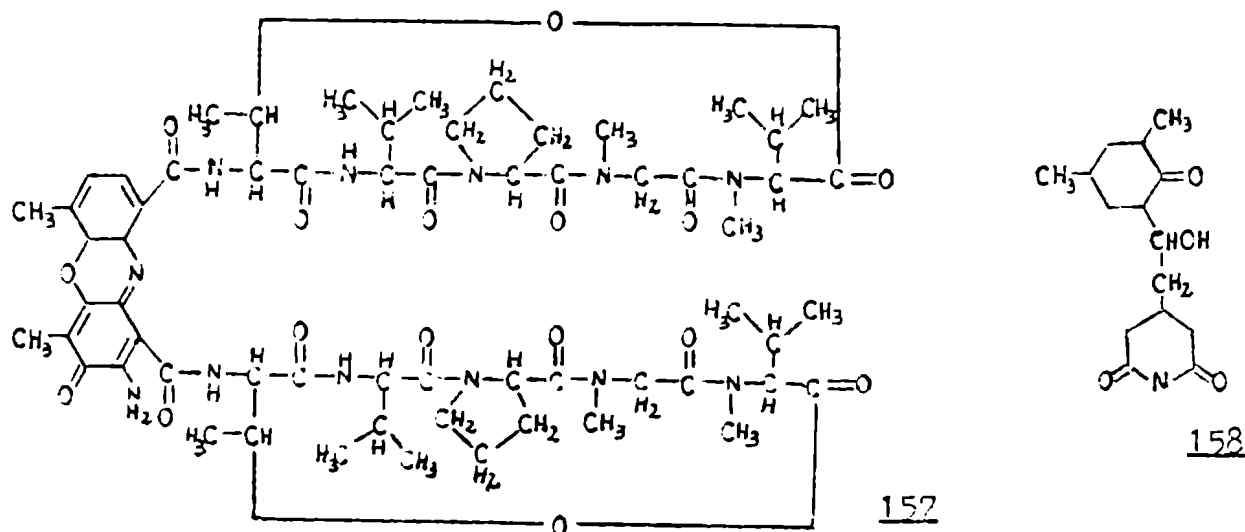
También es importante la existencia de un tiempo de latencia antes de la expresión de la respuesta, así como la perdurabilidad del efecto una vez desencadenado, aún en ausencia del esteroide iniciador.

Este mecanismo fue analizado en detalle y confirmado en el caso del efecto inhibitorio de cortisol (3) sobre la entrada y utilización de uridina por linfocitos tumorales (P1798) <sup>154</sup>.

Stevens demostró en dicho trabajo <sup>154</sup> que el lavado de 8 del medio de incubación luego de 30' de interacción con las células tumorales no impedía el efecto inhibitorio del esteroide. Si dentro de esos primeros 30' se agregaba actinomicina D (157) (inhibidor de la síntesis de ARN) ó entre los 30 y 60' se suministraba cicloheximida (158) (inhibidor de la síntesis proteica), el efecto de 8 se bloqueaba. En cambio el agregado de hidroxiaurea (inhibidor de la síntesis de ADN) no modificó la inhibición causada por el esteroide.

Estos experimentos demuestran que en dicho sistema, 8 inhibe la síntesis de ARN a través de un mecanismo que requiere la síntesis de ARN y posteriormente la síntesis de proteínas para su expresión, pero no la síntesis de ADN, reafirmando el mecanismo clásico propuesto.

Munck y colaboradores <sup>144</sup> demostraron que la inhibición de la acumulación de glucosa-6-fosfato en timocitos de rata causada por 8, se producía a través de un paso irreversible (el lavado



o desplazamiento con cortexolona (7) de 3 luego de unos minutos de interacción no eliminó el efecto inhibitorio), un paso que requería la síntesis de ARN (sensible a la actinomicina D (157), este paso podría ser o no el paso irreversible anteriormente mencionado), y un paso sensible a la temperatura de incubación (que no coincidía con el paso irreversible sino que ocurriría posteriormente en la serie de eventos que culminan con la respuesta celular). Por lo tanto 3 también ejerce su acción glucocorticoide en timocitos de rata a través de un mecanismo clásico.

La no saturabilidad del efecto de 10 sugiere la posibilidad de un mecanismo no mediado por receptores (una de las particularidades del mecanismo clásico es la baja capacidad).

Las características que debe tener la acción de un esteroide para considerar que ejerce su efecto a través de un mecanismo no genómico fueron detalladas por Homo y colaboradores <sup>152</sup>:

- Efecto instantáneo o de latencia muy corta.
- Recuperación muy rápida luego de la eliminación del esteroide.
- Insensibilidad frente a inhibidores de síntesis de ARN y proteínas.

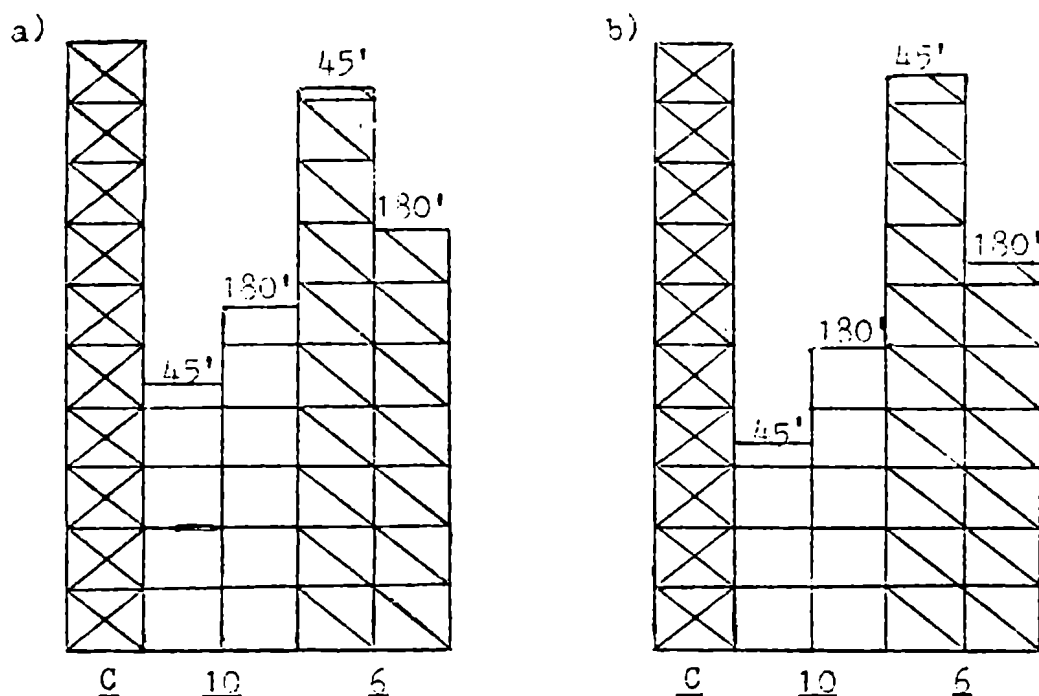
Estos tres puntos se ensayaron en 10 ( $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M) y 6 ( $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  M), utilizando este último esteroide como control, ya que su acción se ejerce a través del mecanismo clásico.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

##### IV.3.1. Acción inmediata:

Para verificar si  $11\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10) requería de cierta latencia para manifestar su efecto, se redujo el tiempo de incubación drásticamente. Las condiciones normales de trabajo consistieron en 3 hs de incubación, 30' antes del final de las cuales se agregó  $^3\text{H}$ -uridina, analizándose luego su entrada a la célula y su utilización. Para el análisis de la acción rápida se redujo el tiempo total de incubación a 45' y el del pulso de  $^3\text{H}$ -uridina a 15'. Los resultados obtenidos con 10 ( $10^{-4}$  M) y 6 ( $10^{-4}$  M) se resumen en la figura 78.

La fracción soluble en ácido perclórico 5 % da idea del efecto esteroidal sobre la entrada de  $^3\text{H}$ -uridina a la célula, mientras que la fracción insoluble indica el efecto sobre la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN.



**Figura 28:** Efecto de  $\Delta^1-11\beta$ -hidroxiprogesterona (10) y corticosterona (6) sobre la entrada (a) e incorporación (b) de  $^3\text{H}$ -uridina según el tiempo de incubación (C: control).

Como puede verse, la disminución del tiempo de incubación no modificó el fuerte efecto inhibitorio de 10 ( $10^{-4}$  M) mientras que la inhibición en la entrada e incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina debida a 6 ( $10^{-4}$  M) se vio notablemente disminuida (los efectos de 6 sobre las fracciones soluble e insoluble en ácido perclórico 5 % luego de 45' de incubación no son significativos respecto de los controles, según el test de Student <sup>141</sup>).

Por lo tanto la acción de  $\Delta^1-11\beta$ -hidroxiprogesterona (10) sería inmediata, o al menos mucho más rápida que el efecto de los glucocorticoides clásicos, representados por corticosterona (6), cumpliendo así con el primer requisito para un mecanismo no genómico.

## IV.3.2. No perdurabilidad del efecto en ausencia del esteroide:

Como se indicara en la introducción, un esteroide que actúa a través del mecanismo clásico solo requiere interactuar con la célula blanco durante un período inicial, gatillando una secuencia de eventos que continúa incluso si se elimina el esteroide. En cambio un mecanismo no genómico, por ejemplo a nivel de membrana plasmática, requiere de la presencia permanente del esteroide.

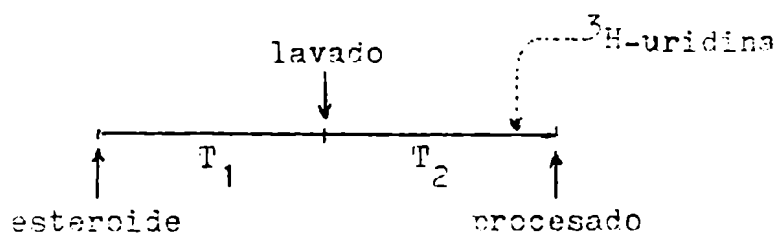
Los primeros ensayos con 10 y 6 se realizaron incubando las células en presencia o no de esteroide durante 40' ( $T_1$ ). Ese tiempo es suficiente para la interacción hormona-receptor<sup>155</sup>. Luego se eliminaron los esteroides por lavado con medio de cultivo y se reincubaron las células en medio libre de esteroides, completando las 3 hs de incubación ( $140' = T_2$ ). Los resultados se resumen en la tabla IV-3 (items 1, 3, 6-11).

En dichas condiciones, el efecto inhibitorio de 10  $10^{-4}$  M desapareció totalmente (item 3) tanto en la fracción soluble como en el precipitado en ácido perclórico 5 % (diferencias no significativas con los controles según el test de Student<sup>141</sup>).

En cambio 6  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  M ejerció una acción irreversible sobre el timocito durante 40' de interacción que se tradujo al cabo de las tres horas de incubación en la inhibición de la entrada y utilización de  $^3\text{H}$ -uridina (items 9 y 11), del mismo orden que cuando el esteroide se hallaba siempre presente (180'. Items 8 y 10).

A diferencia de lo que sucedió a la concentración  $10^{-4}$  M cuando se realizó esta experiencia utilizando 10 a la concentración

Tabla IV-3: Efecto de la eliminación del esteroide del medio de cultivo en la acción de  $\Delta^1-11\beta$ -hidroxiprogesterona (10) y corticosterona (6) a distintas concentraciones sobre la entrada (S) e incorporación (P) de  $^3\text{H}$ -uridina.



It.	Esteroides	Conc.	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	s <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
1	<u>10</u>	10 <sup>-4</sup> M	180'	-	-61±2	-62±2
2	<u>10</u>	10 <sup>-4</sup> M	40'	60'	+32±4	+53±6
3	<u>10</u>	10 <sup>-4</sup> M	40'	140'	+ 3±3	+ 5±3
4	<u>10</u>	10 <sup>-4</sup> M	120'	60'	+44±5	+59±4
5	<u>10</u>	10 <sup>-4</sup> M	120'	140'	+15±10	+16±4
6	<u>10</u>	10 <sup>-5</sup> M	180'	-	-23±2	-19±2
7	<u>10</u>	10 <sup>-5</sup> M	40'	140'	-19±1	-17±2
8	<u>6</u>	10 <sup>-4</sup> M	180'	-	-45±3	-43±2
9	<u>6</u>	10 <sup>-4</sup> M	40'	140'	-41±2	-41±3
10	<u>6</u>	10 <sup>-5</sup> M	180'	-	-33±3	-35±2
11	<u>6</u>	10 <sup>-5</sup> M	40'	140'	-25±5	-31±4

- a) Fracción soluble en ácido perclórico 5 %, como porcentaje de estimulación (+) o inhibición (-) respecto del control.
- b) Fracción insoluble en ácido perclórico 5 %, como porcentaje de estimulación (+) o inhibición (-) respecto del control.

$10^{-5}$  M, el pequeño efecto del esteroide se mantuvo a pesar del lavado (items 6 y 7).

Por lo tanto 10 a la concentración  $10^{-5}$  M produciría su acción a través de un mecanismo clásico (al menos en cuanto a la existencia de un paso inicial irreversible). En cambio a la concentración  $10^{-4}$  M no produjo una acción irreversible sobre el timocito, recuperándose éste rápidamente cuando se eliminó el esteroide.

De este modo se demostró que 10  $10^{-4}$  M cumple con el segundo requisito para considerar que su efecto se produce por un mecanismo no genómico.

Para verificar que la desaparición del efecto de 10 no se debía a que requería más tiempo de interacción, se decidió dejar los timocitos en contacto con el esteroide durante 2 hs, antes de su lavado ( $T_1$ ). Luego se reincubó 1 hora en ausencia de 10 ( $T_2$ ) completando así las tres horas de incubación total. Este experimento fue cronológicamente anterior a los ensayos acerca del efecto inmediato de 10 (ver IV.3.1., pág. 298), el cual demostró que, de producirse un efecto irreversible, este debía haber sucedido dentro de los 40' iniciales debido a que se observó inhibición luego de 45' de incubación (30' + 15' de pulso de  $^3\text{H}$ -uridina). El lavado del esteroide luego de más tiempo de interacción con el timocito arrojó resultados muy interesantes.

Cuando se eliminó el esteroide 10 ( $10^{-4}$  M) luego de 2 hs de contacto con las células y se reincubaron estas en medio libre de esteroide, se observó la estimulación de la entrada y utilización de  $^3\text{H}$ -uridina (Tabla IV-3, item 4).



Este interesante resultado planteó varios interrogantes:

- Si la estimulación se debía al mayor tiempo de interacción este roide-timocito (de 40' a 120') o a la disminución del tiempo de recuperación (de 140' a 60') luego del lavado.
- Si el aumento en la marcación de la fracción insoluble en ácido perclórico se trataba de ARN ó resultaba de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina, como tal o modificada, a otra sustancia insoluble.

Para responder al primer punto se realizaron dos tipos de experimentos. En el primero se permitió interactuar la hormona con el timocito por 40' ( $T_1$ ), se lavó y se reincubó solo 60' más ( $T_2$ ). En el segundo, la primera incubación fue de 120' ( $T_1$ ), mientras que la reincubación se extendió a 140' ( $T_2$ ) (tabla IV-3, items 2 y 5 respectivamente).

Como puede verse, el efecto estimulatorio de la entrada y utilización de  $^3\text{H}$ -uridina se produjo cuando se analizó el estado celular luego de un pequeño período de reincubación. En cambio cuando se dejaron los timocitos durante un período más prolongado antes de verificar la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina, dicho efecto desapareció (aparentemente en forma algo más lenta cuando la interacción fue más prolongada).

Por lo tanto cuando se eliminó 10 del medio de cultivo se produjo una alteración celular transitoria que resultó en la estimulación de la entrada de  $^3\text{H}$ -uridina en el timocito y su incorporación a la fracción insoluble en ácido perclórico 5 %. Dicho efecto

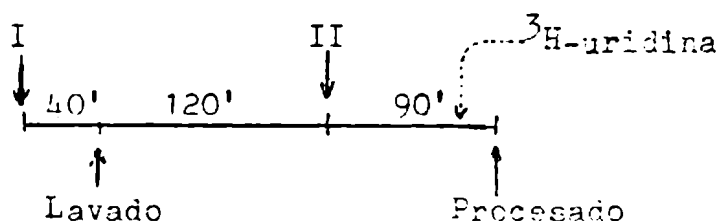
to transitorio no se vería afectado mayormente por el tiempo de interacción entre 10 y el timocito.

Dado que existen antecedentes de la incorporación de radioactividad procedente de  $^3\text{H}$ -uridina en fosfolípidos <sup>156</sup>, insolubles en ácido perclórico 5 %, cabía la posibilidad de que el aumento de radioactividad se tratara de un incremento en la síntesis de fosfolípidos, por ejemplo los de la membrana celular debido a la desestabilización de la misma cuando se eliminó el esteroide. Para verificar si el incremento de radioactividad en la porción insoluble se trataba de ARN en los sistemas de  $T_2 = 60'$  (tiempo de recuperación), dicho precipitado fue sometido a la digestión con ARNasa. En este caso se produjo la solubilización total de la radioactividad, con lo cual puede concluirse que realmente se produjo un aumento en la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN.

Finalmente se decidió verificar si la eliminación de 10 por lavado no afectaba la respuesta celular frente a un nuevo agregado de esteroide. Para ello se incubaron timocitos en presencia o no de 10 ( $10^{-4}$  M) durante 40', se eliminó el esteroide por lavado y se reincubaron las células en medio libre de esteroide durante 120' (para que desaparezca el efecto de estimulación transitoria), se agregó 10 ó 6 ( $10^{-4}$  M), continuándose la incubación durante 90' más. Los resultados se resumen en la tabla IV-4.

Como puede verse, la respuesta de las células a la acción de 10 ( $10^{-4}$  M) ó de un glucocorticoide natural (6) luego de haber interactuado previamente con el primero ( $10^{-4}$  M), fue la misma que

Tabla IV-4: Efecto de la incubación de timocitos con  $\Delta^1-11\beta$ -hidroxi progesterona (10) y remoción del mismo, sobre la respuesta de las células al nuevo agregado del esteroide, o al agregado de corticosterona (6).



I	II	S (a)	P (b)	n (c)
c <sup>(d)</sup>	<u>10</u>	67 ± 5	62 ± 3	6
<u>10</u>	<u>10</u>	59 ± 3	52 ± 6	6
c <sup>(d)</sup>	<u>6</u>	22 ± 2	46 ± 8	3
<u>10</u>	<u>6</u>	32 ± 3	47 ± 4	3

- (a) fracción soluble en ácido perclórico 5 %, como % de inhibición respecto del control.
- (b) fracción insoluble en ácido perclórico 5 %. como % de inhibición respecto del control.
- (c) número de casos.
- (d) primer período de incubación libre de esteroide.

la que se produjo en células no tratadas. Por lo tanto la eliminación de 10 del medio de cultivo no afectó la respuesta de las células presentes a nuevos agregados de dicho esteroide o de otros.

### IV.3.3. Acción de la actinomicina D:

El último requisito para considerar que una acción hormonal se produce a través de un mecanismo no genómico es que no se afecte por inhibidores de síntesis de ARN ó proteínas. Para ello se eligió la actinomicina D (152) (ver estructura correspondiente en la pág. 297) como inhibidor de síntesis de ARN.

El primer paso fue la elección de la dosis de actinomicina D. Para ello se realizaron incubaciones en presencia de distintas cantidades de actinomicina D, analizándose la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina luego de 180' o de 45' de acción del antibiótico (30' y 15' de pulso de  $^3\text{H}$ -uridina respectivamente). Los resultados pueden verse en la tabla IV-5.

Tabla IV-5: Efecto de la actinomicina D sobre la captación (S) e incorporación (P) de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN en timocitos.

T(a)	Act.D(b)	S(c)	P(c)	n(d)
180'	0,05	17 ± 4	43 ± 6	5
	0,1	18 ± 2	64 ± 2	8
	0,3	18 ± 4	79 ± 3	8
45'	0,3	13 ± 9	73 ± 3	3
	0,5	18 ± 4	84 ± 1	3

(a) Tiempo de incubación.

(b)  $\mu\text{g/ml}$ .

(c) % de inhibición respecto del control (libre de antibiótico).

(d) número de casos.

Como puede observarse, la actinomicina D actuó en forma casi exclusiva sobre la fracción insoluble (P) en ácido perclórico 5 %, lo cual era de esperar ya que el antibiótico afecta solo la síntesis de ARN y no el transporte de nucleótidos a través de la membrana plasmática.

Por esta razón, para el análisis de la inhibición producida por  $\Delta^1-11\beta$ -hidroxiprogesterona (10) sobre la entrada de  $^3\text{H}$ -uridina a la célula (fracción soluble) podría utilizarse cualquiera de las dosis indicadas, preferentemente las que producen mayor inhibición en la síntesis de ARN para asegurar el bloqueo de este posible paso de la acción hormonal.

En cambio cuando se desea analizar la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN no es posible utilizar la dosis máxima de antibiótico ya que esta haría decrecer a tal punto la síntesis de ARN que no sería posible observar la posterior inhibición sobre dicha síntesis debida al esteroide. Por lo tanto se debió llegar a una elección de compromiso en cuanto a la cantidad de actinomicina D utilizada, es decir, suficientemente grande como para producir un eficiente bloqueo de dicho paso de la acción hormonal, pero no tanto como para impedir la observación de una posible inhibición debida a la hormona.

Se eligió una concentración de 0,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de actinomicina D, la cual produjo una inhibición del 70 % en la síntesis de ARN. De este modo el efecto inhibitorio del antibiótico es suficiente para denotar si el mecanismo de acción del esteroide analizado requiere la síntesis de ARN (Stevens <sup>154</sup> observó una notable reducción del efecto inhibitorio de cortisol (8) con concentraciones de

actinomicina D que producían solo un 36 % de inhibición de la síntesis de ARN), dejando un cierto porcentaje de síntesis sobre la cual analizar el efecto del esteroide.

El experimento consistió en la incubación de los timocitos durante 30' en presencia y ausencia de actinomicina D (tiempo suficiente, como se desprende de la tabla IV-5, para que el antibiótico ejerza su acción). Al cabo de ese tiempo se agregó 10 al 50 % de las células de cada grupo (con y sin actinomicina D) continuándose la incubación durante 45' más (pulso de  $^3\text{H}$ -uridina los últimos 15'). Los resultados se resumen en la tabla IV-6.

Como puede verse, el efecto de 10 ( $10^{-4}$  M) en la entrada a la célula e incorporación a ARN de uridina no se afectó en presencia de un inhibidor de la síntesis de ARN. Por lo tanto el esteroide cumple con el tercer requisito para considerar que su acción se produce a través de un mecanismo no genómico.

Para confirmar que la cantidad de antibiótico es suficiente para producir la anulación del efecto, de producirse este a través de la síntesis de ARN como los corticoides clásicos, se ensayó la inhibición de la actinomicina D sobre el efecto de 6 ( $10^{-6}$  M).

Para ello se debió modificar levemente las condiciones de trabajo ya que, como se discutiera anteriormente, 45' de incubación no son suficientes para la expresión del efecto de 6. Por lo tanto se extendió la segunda parte de la incubación a 90' (pulso de  $^3\text{H}$ -uridina los últimos 15')(tabla IV-6).

En las condiciones precedentes, la actinomicina D produjo la desaparición del efecto inhibitorio de 6, como era de esperarse si la inhibición producida por el antibiótico era suficiente para bloquear el mecanismo genómico.

Tabla IV-6: Efecto de la actinomicina D en la acción de  $\Delta^1$ -11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (10) y corticósterona (6) en la entrada a la célula (S) e incorporación a ARN (P) de  $^3\text{H}$ -uridina en timocitos.

	S <sup>(a)</sup>		P <sup>(b)</sup>	
	Cpm/10 <sup>7</sup> cel.	% I <sup>(c)</sup>	Cpm/10 <sup>7</sup> cel.	% I <sup>(c)</sup>
C	19.269 $\pm$ 405	-	8.231 $\pm$ 360	-
<u>10</u>	7.766 $\pm$ 476	60 $\pm$ 3	4.729 $\pm$ 371	43 $\pm$ 11
Act.D	17.542 $\pm$ 452	-	2.328 $\pm$ 334	-
Act.D + <u>10</u>	6.157 $\pm$ 288	65 $\pm$ 2	1.277 $\pm$ 83	45 $\pm$ 4
C	4.270 $\pm$ 231	-	2.873 $\pm$ 156	-
<u>6</u>	2.693 $\pm$ 170	37 $\pm$ 4	1.368 $\pm$ 175	35 $\pm$ 6
Act.D	3.399 $\pm$ 204	-	442 $\pm$ 110	-
Act.D + <u>6</u>	3.384 $\pm$ 185	1 $\pm$ 5 <sup>(d)</sup>	449 $\pm$ 85	(e)

(a) Fracción soluble en ácido perclórico 5 %.

(b) Fracción insoluble en ácido perclórico 5 %.

(c) % de inhibición respecto de la incubación sin esteroide correspondiente.

(d) No significativo <sup>141</sup>.

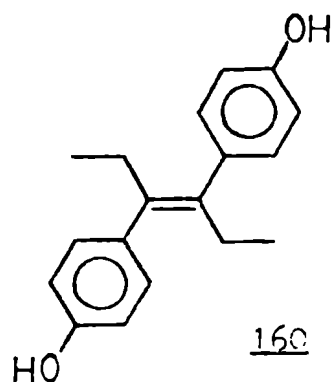
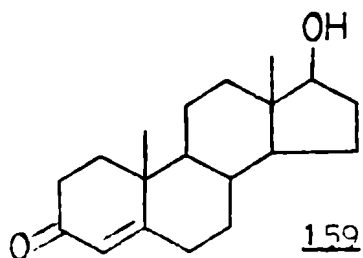
(e) 2 % de estimulación (no significativo).

Por todo lo antedicho,  $\Delta^1$ -11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (10) ejerce un efecto inhibitorio sobre la entrada y utilización de uridina en timocitos de ratas adrenalectomizadas a través de un mecanismo distinto del clásico (al menos a concentraciones superiores a 10<sup>-5</sup> M).

Este comportamiento a altas concentraciones de 10 en células de timo tiene como antecedente el efecto de testosterona (159), progesterona (1) y algunos compuestos estrogénicos no esteroideos como el dietilestilbestrol (160) <sup>152</sup>, los cuales ejercen su acción sobre la incorporación de uridina en forma inmediata. Dicho efecto no se observó a concentraciones inferiores a  $10^{-6}$  M, creciendo en forma abrupta por encima de  $10^{-5}$  M, en forma similar a lo que sucede con 10.

En un trabajo presentado por Gagne y colaboradores <sup>157</sup> se analizó dicho efecto a altas concentraciones en función del tiempo, mediante el agregado simultáneo de <sup>3</sup>H-uridina y esteroide al principio del experimento. Los autores constataron que el efecto inhibitorio observado era transitorio, presentando un máximo dentro de los primeros 15-45'. Dicho efecto se produciría principalmente sobre la entrada de nucleósido a la célula, postulando un efecto a nivel de membrana.

Las acciones esteroideas a través de mecanismos no genómicos se asocian en general con interacciones a nivel de membrana (plasmática, lisosomal, mitocondrial) <sup>152</sup>.





La hipótesis de una estabilización de la membrana fue considerada con atención, especialmente luego de las investigaciones realizadas acerca del importante papel del colesterol en la arquitectura de la membrana y en el control de su fluidez <sup>158</sup>. Existen autores que sugieren que el esteroide se insertaría en la capa de fosfolípidos en lugar del colesterol <sup>159</sup>. Sin embargo cuando se estudió la distribución de varios esteroides en interfases lípido-agua naturales o artificiales, varios autores encontraron que las moléculas esteroideas no se incorporaban a la estructura de membrana sino que se ubicaban en su superficie, junto a las cabezas polares de los fosfolípidos <sup>160</sup>. La acumulación de moléculas hidrofóbicas alrededor de la membrana, así como su interacción con componentes de la misma, probablemente produzcan alteraciones en las propiedades de membrana, especialmente a concentraciones mayores de  $10^{-5}$  M. Esta localización explicaría la facilidad de remoción del esteroide y con ella la desaparición del efecto del mismo.

La localización de 10 en la membrana del timocito sería la causante de la inhibición de la entrada de uridina a la célula (disminuye la radioactividad encontrada en la fracción soluble) la cual justificaría en gran medida la disminución de la incorporación de <sup>3</sup>H-uridina a ARN (por falta de sustrato marcado dentro de la célula con el cual sintetizar ARN marcado).

Esto justificaría a su vez la falta de lisis celular sin apartarse del mecanismo clásico, que indica que la inhibición en la síntesis de ARN desencadena la lisis. En el caso de 10 ( $10^{-4}$  M) se observó una disminución en la incorporación de <sup>3</sup>H-uridina a ARN. Sin embargo dicha disminución podría no deberse a una inhibición de

la síntesis de ARN sino a la disminución de la  $^3\text{H}$ -uridina disponible para ser incorporada, debido a la inhibición en la entrada de la misma a la célula. Por lo tanto en realidad no habría inhibición real sobre la síntesis de ARN (o ésta sería pequeña), como consecuencia de lo cual no sería de esperar que se produjera lisis.

Los resultados obtenidos indican que el efecto de 10 a altas concentraciones ( $10^{-4}$  M) es tal que además de producir una fuerte inhibición sobre la entrada de  $^3\text{H}$ -uridina a la célula, produciría también la desaparición del pequeño efecto genómico observado a menor concentración. El lavado de las células que estuvieron en contacto con 10 ( $10^{-4}$  M), por ejemplo, produjo la desaparición total del efecto inhibitorio, no quedando siquiera el efecto observado a  $10^{-5}$  M, el cual se mantenía luego del lavado, como se demostrara en otros experimentos (tabla IV-3, items 3 y 7, pág. 301).

En cuanto a la estimulación que se observó luego de la eliminación por lavado de la hormona, esta podría deberse a la desestabilización de la membrana debido a la remoción del esteroide de la misma (o de su entorno), recuperando su estado original luego de 2 hs. La estimulación observada indicaría una considerable interacción membrana-esteroide ya que el simple lavado de la célula en ausencia de esteroide no produjo ningún efecto. La estimulación se produciría sobre el transporte de  $^3\text{H}$ -uridina hacia el interior de la célula, mientras que el aumento de marcación observada en el ARN se debería a la mayor disponibilidad de nucleósido marcado para la síntesis de este último.

La recuperación fue total ya que luego de 2 hs de reincubación la célula respondió a 10 normalmente. Por lo tanto durante

el lavado no se perdió ningún componente de membrana que estuviera interactuando con el esteroide ya que en ese caso la célula no volvería a responder. Nuevamente en este caso es posible que el único proceso afectado sea la entrada de  $^3\text{H}$ -uridina a la célula.

En conclusión,  $\Delta^1$ -11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (10) a concentraciones superiores a  $10^{-5}$  M produjo una fuerte inhibición en la entrada de  $^3\text{H}$ -uridina a timocitos de ratas adrenalectomizadas, a través de un mecanismo no genómico, probablemente producido a nivel de membrana plasmática.

Los requerimientos estructurales para que un esteroide ejerza el efecto observado a través de un mecanismo no genómico probablemente sean distintos de los necesarios para un mecanismo clásico. Por lo tanto en el análisis de los requerimientos estructurales para que se produzca el efecto glucocorticoide no debe considerarse el caso de 10 a una concentración de  $10^{-4}$  M, o debe trabajarse con los resultados obtenidos a concentraciones inferiores ó iguales a  $10^{-5}$  M donde el efecto a nivel de membrana sería nulo.

De trabajarse a altas concentraciones para la correlación indicada también resultaría riesgoso considerar los datos correspondientes a 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (2) (en este caso se determinó que el lavado del esteroide eliminaba el efecto inhibitorio al igual de lo que sucedió con 10), 11-desoxicorticosterona (4) y su  $\Delta^1$ -derivado (12) (debido a que sus curvas dosis-respuesta fueron similares a las de 2).

Los requerimientos estructurales para que se produzca el mecanismo no genómico se discuten en el capítulo V.

CAPITULO V

CORRELACION

ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

## CORRELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

En el capítulo anterior se han discutido la capacidad de los esteroides analizados (figura 1, pág. 4) de inhibir la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN en timocitos y la, cronológicamente posterior, disminución en la viabilidad celular. Por lo tanto se dispone de dos parámetros glucocorticoides que se pueden intentar correlacionar con las características estructurales de los esteroides correspondientes. Sin embargo, como también se discutiera anteriormente, existen tres criterios distintos para analizar la potencia esteroideal en cuanto a su actividad como inhibidor de la síntesis de ARN (sensibilidad, actividad en el plateau, actividad máxima), por lo que en realidad se dispone de cuatro ordenamientos distintos según la actividad y criterio elegido, los cuales para mayor comodidad se repiten aquí (con el agregado de los esteroides inactivos):

- Inhibición de la síntesis de ARN:

- Sensibilidad:

$\underline{16} > \underline{8} > \underline{6}, \underline{14} \geq \underline{4}, \underline{12} > \underline{2} > \underline{5}, \underline{10} > \underline{13} > \underline{15}, \underline{7}, \underline{11}, \underline{3}$

- Valor plateau:

$\underline{8}, \underline{16} > \underline{6}, \underline{14} > \underline{2}, \underline{12}, \underline{4}, \underline{5} > \underline{10} > \underline{13} > \underline{15}, \underline{7}, \underline{11}, \underline{3}$

- Actividad máxima:

$$\underline{10} > \underline{16}, \underline{14}, \underline{2}, \underline{12}, \underline{8}, \underline{4}, \underline{6} \geq \underline{5} > \underline{13} > \underline{15}, \underline{7}, \underline{11}, \underline{3}$$

- Lisis celular:

$$\underline{16}, \underline{6}, \underline{8}, \underline{14} > \underline{5}, \underline{13} > \underline{4}, \underline{12} > \underline{7}, \underline{15} > \underline{11}, \underline{3}, \underline{2}, \underline{10}$$

(las estructuras correspondientes se resumen en la figura 1, pág. 4 ).

Antes de comenzar un análisis sobre relación estructura-actividad biológica cabe recordar la propuesta de Raynaud y colaboradores <sup>22</sup> de dividir los sustituyentes en dos grandes grupos:

- Los sustituyentes imprescindibles "per se".

- Los moduladores de efecto.

- Introducción de un doble enlace 1,2: Existen antecedentes al respecto en trabajos de Duax y colaboradores <sup>13</sup> y de Raynaud y colaboradores <sup>22</sup>, mencionados en la introducción de esta tesis, donde se indica que la insaturación 1,2 aumenta o mantiene la actividad glucocorticoide, considerando que esto se debía a la mayor curvatura del esteroide insaturado.

Como puede verse en los ordenamientos indicados anterior

mente, se han determinado casos en que la introducción de la insaturación 1,2 disminuyó la actividad (11 $\beta$ -hidroxiprogesterona y su  $\Delta^1$ -derivado (2 y 10) en cuanto a sensibilidad y actividad en el plateau, y 21-desoxicortisol y su  $\Delta^1$ -derivado (5 y 13) en los tres criterios de inhibición de síntesis de ARN) a pesar de que los estudios conformacionales por espectrometría de RMN- $^{13}\text{C}$  indicaron la curvatura de los esteroides en similar proporción (III.4, pág.233).

Los antecedentes mencionados <sup>13,22</sup> acerca del efecto del doble enlace 1,2 en la actividad glucocorticoide siempre corresponden a experiencias sobre derivados de cortisol (8). En ese caso los resultados concuerdan con los presentados en esta tesis ( $\Delta^1$ -cortisol (16) resultó más sensible que 8 y los valores plateau y máximo de ambos fueron similares). Otro tanto sucedió con esteroides que, aunque no presentaban la funcionalidad completa de 8, poseían un hidroxilo en posición 21 (11-desoxicorticosterona (4), corticosterona (6) y sus  $\Delta^1$ -derivados (12 y 14)). En cambio las discrepancias surgieron cuando no se encontraba presente dicho hidroxilo (2/10; 5/13) (no se mencionan los pares cortexolona (7)/ $\Delta^1$ -cortexolona (15) y 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3)/ $\Delta^1$ -17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (11) ya que no presentaron actividad en ningún caso, y por lo tanto no tiene sentido considerar si uno es más, menos o igualmente "activo" que su  $\Delta^1$ -derivado).

Por lo tanto el aumento en la curvatura del esteroide debido a la introducción de un doble enlace 1,2 sería beneficiosa solo en el caso de los compuestos 21-hidroxilados, al menos en las condiciones de inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina en que se determinó la sensibilidad y el valor plateau de los esteroides

y que correspondería a la acción mediada por la unión a un receptor específico.

El caso particular de la acción a concentraciones máximas ( $10^{-4}$  M) será discutido con posterioridad debido a la complejidad del mismo.

La introducción de un doble enlace 1,2 no afectó el efecto lítico en ninguno de los casos analizados (aún en los que se observaron diferencias en cuanto a la inhibición en la síntesis de ARN).

- Hidroxilación 11 $\beta$ : En este caso la situación resultó mucho más clara. Todos los parámetros glucocorticoides analizados indicaron que la presencia de dicho grupo funcional aumenta la actividad (ver los ordenamientos de los pares 7/2, 4/6, 3/5 y sus  $\Delta^1$ -equivalentes), en algunos casos en forma muy significativa. Por ejemplo 3 y 16 resultaron poderosos inhibidores de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN, mientras que sus 11-desoxiderivados fueron inactivos.

El análisis conformacional por RMN- $^{13}\text{C}$  (ver III.4 y III.6 pág. 240 y 253) indicó una mayor curvatura de los esteroides 11 $\beta$ -hidroxilados, confirmando en solución cálculos teóricos realizados por Schmit y Rousseau<sup>16</sup> en condiciones libres de interacción. Estos últimos indicaron un menor efecto del hidroxilo 11 $\beta$  sobre la curvatura del esteroide, respecto de lo que produce una insaturación 1,2.

Sin embargo el efecto del hidroxilo 11 $\beta$  sobre la actividad glucocorticoide fue más nítido que el del doble enlace, a pesar de la menor curvatura. Esto permite suponer que el hidroxilo 11 $\beta$



afectaría la actividad de por sí y no como modulador mediante un cambio conformacional que optimice la localización espacial de otros grupos.

También el efecto del hidroxilo  $11\beta$  podría considerarse que se produce a través del cambio conformacional, produciendo la "curvatura óptima" del esteroide (no necesariamente la curvatura máxima). Sin embargo es posible descartar esta suposición ya que el aumento de actividad por introducción de un hidroxilo en posición  $11\beta$  se observó tanto en los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides como en sus  $\Delta^1$ -derivados, notablemente más curvados.

La importancia del hidroxilo  $11\beta$  podría deberse a su carácter de donar de puentes de hidrógeno, constituyendo uno de los puntos de anclaje del esteroide en un hipotético receptor.

- Hidroxilación 21: La hidroxilación sobre C21 aumentó la inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN en las condiciones en que se determinó sensibilidad y actividad en el plateau, es decir por debajo de una concentración de  $10^{-5}$  M. Como se discutiera anteriormente dichas condiciones corresponderían a una acción mediada por la unión al receptor. La hidroxilación en posición 21 produjo también un aumento en la acción lítica de los esteroides analizados.

Nuevamente en este caso se descarta un efecto modulador del hidroxilo 21 a través de una alteración conformacional del esqueleto esteroideal ya que el análisis por RMN- $^{13}\text{C}$  indicó que la conformación del mismo no se modificó por hidroxilación en C21 (ver III.4., pág. 243).

Resulta poco probable que tenga importancia la capacidad del hidroxilo 21 de formar puentes de hidrógeno intramoleculares con el carbonilo 20, determinado por RMN- $^{13}\text{C}$  (III.5., pág. 244), en cuanto a la modificación de la potencia glucocorticoide. Dicha formación de puentes de hidrógeno con el carbonilo, restaría capacidad de formación de puentes de hidrógeno con el receptor, en el que este último actuaría como donador, anulando en parte la función del carbonilo, por lo cual el efecto glucocorticoide debería disminuir, hecho que no se observó. La presencia imprescindible del carbonilo 20 está ampliamente reconocida ya que un 20-metilenderivado resulta inactivo <sup>19</sup>.

Sin embargo no es posible descartar con los datos disponibles para la conformación en solución que la formación de puentes de hidrógeno favoreciera la disposición espacial del carbonilo 20 para la unión al receptor (dicha modificación en la conformación debería entonces compensar y superar el efecto desfavorable del hidroxilo 21 debido al bloqueo de sitios aceptores de puentes de hidrógeno en el carbonilo 20).

Estas deducciones serían válidas si las condiciones del sitio receptor fueran hidrofóbicas y por lo tanto permitieran la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares (en agua los mismos competirían en forma desfavorable con el solvente).

Schmit y Rousseau <sup>15</sup> indicaron por minimización de energía que la 21-hidroxilación no modifica la conformación de la cadena lateral, para la molécula aislada, libre de interacciones externas.

Por lo tanto el efecto del hidroxilo 21 en cuanto al au-

mento de la acción glucocorticoide también se debería, aunque con reservas al respecto, a la presencia del mismo y no como modulador.

Los monohidroxiesteroides 2, 10, 4 y 12 presentaron actividad en cuanto a la inhibición en la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina en ARN. En cambio los esteroides 3 y 11 ( $17\alpha$ -hidroxilados) fueron inactivos.

- Hidroxilación  $17\alpha$ : La introducción de un hidroxilo en posición  $17\alpha$  incrementó la sensibilidad y el valor plateau en el par 6/8 y sus  $\Delta^1$ -derivados (14/16), mientras que disminuyó la actividad glucocorticoide en el resto de los casos (2/5, 4/7 y sus  $\Delta^1$ -derivados 10/13 y 12/15). En el par 2/5 y sus  $\Delta^1$ -derivados el efecto fue pequeño, mientras que la hidroxilación en C17 de 11-desoxicorticosterona (4) produjo la inactivación completa del esteroide en cuanto a la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina.

En el aspecto conformacional, no se detectaron modificaciones del esqueleto esteroideal por RMN- $^{13}\text{C}$  (ver III-4, pág. 241), aunque Schmit y Rousseau <sup>17</sup> indicaron que la hidroxilación en C17 modifica la curvatura del esteroide, haciéndolo más plano (en contraposición con la hidroxilación  $11\beta$  y la introducción de un doble enlace 1,2) especialmente en la región de los anillos C y D. Además calcularon que la conformación más estable de la cadena lateral se desplaza unos  $20^\circ$ .

Una posible explicación de los resultados sería que el hidroxilo  $17\alpha$  al modificar la conformación de la cadena lateral, haría que el hidroxilo 21 se ubique en una posición inadecuada pa

ra unirse al receptor, disminuyendo así su actividad. De allí que la 17 hidroxilación de 4 lo transforme en un compuesto inactivo. En cambio la rotación de la cadena lateral no afectaría mayormente el efecto inhibitorio en el caso de  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2) posiblemente debido a un mayor rango efectivo del carbonilo 20, modificándose relativamente poco su actividad. Sin embargo esta propuesta no puede explicar porque cortisol (3) resulta más activo que corticosterona (6) (otro tanto sucede con sus  $\Delta^1$ -derivados), ya que persistiría en este caso la rotación desfavorable de la cadena lateral, lo cual debería disminuir la potencia de los esteroides.

Tampoco es posible explicar la acción ambigua del hidroxilo 17 $\alpha$  por su presencia como tal, dando lugar a una región hidrofílica donde en su ausencia no existía (de ser así debería ser perjudicial en todos los casos).

- Inhibición a altas concentraciones: De la observación de las curvas dosis-respuesta de los distintos esteroides se concluye que salvo algunos casos particulares, el resto de los esteroides se comportó en forma similar a lo que sucede en el plateau. Dichos casos particulares fueron  $\Delta^1$ - $11\beta$ -hidroxiprogesterona (10) y, en menor medida  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2), 11-desoxicorticosterona (4) y  $\Delta^1$ -11-desoxicorticosterona (12).

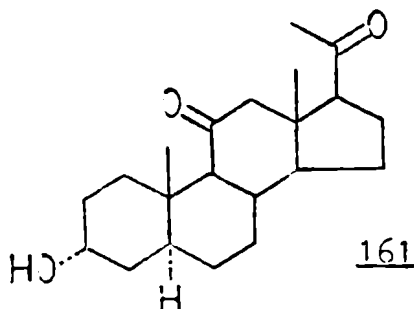
En el caso de 10 se demostró que el mecanismo por el cual actuaría a dicha concentración no es el clásico sino que probablemente correspondería a una interacción a nivel de membrana.

Los esteroides que se apartaron del mecanismo saturable convencional fueron los monohidroxilados que poseían cierta activi

dad a menores concentraciones. El par 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) y su  $\Delta^1$ -derivado a pesar de ser monohidroxiesteroides no produjeron actividad a altas concentraciones, como tampoco tuvieron efecto a menores concentraciones.

Además de dicha menor polaridad (debido al menor grado de hidroxilación), acompañada de cierto grado de actividad glucocorticoide propia (debida a los hidroxilos 11 $\beta$  y 21 característicos), aparentemente se requiere cierto grado de curvatura del esteroide. Es así que el esteroide más curvado de estos, 10, doblemente curvado debido a la presencia del doble enlace 1,2 y del hidroxilo 11 $\beta$ , fue el que más se apartó de la curva ideal de saturación, característica de los esteroides que se expresan a través del mecanismo clásico.

Este hecho, así como la baja polaridad esteroidal, se asemeja al caso de los esteroides anestésicos <sup>161</sup>. Estos son en general derivados de la 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-11,20-diona (161) (alfaxalona), potente anestésico cuya acción se produce a nivel de membrana, probablemente desordenando la misma, a dosis farmacológicas. La configuración  $\alpha$  del hidroxilo de posición 3 confie



re a este esteroide una notable curvatura hacia dicha cara, en forma similar a lo que sucede en 10.

$\Delta^1$ - $11\beta$ -hidroxiprogesterona (10) a altas concentraciones podría afectar la membrana, disminuyendo el transporte de  $^3\text{H}$ -uridina al interior de la célula, afectando por lo tanto la incorporación a ARN.

Debido a la presencia de dos mecanismos a altas concentraciones, el ordenamiento de actividades de los esteroides analizados, no resulta adecuado para su correlación con la estructura esteroideal en busca de los requerimientos para la actividad glucocorticoide, dado que los requerimientos para uno y otro mecanismo pueden ser distintos. De la discusión anterior de los requerimientos para el efecto "plateau" y para el efecto no genómico pueden verse las diferencias notables entre los mismos.

- Lisis celular: En cuanto a este efecto, en general los esteroides analizados guardaron la misma relación que en la inhibición de la síntesis de ARN, salvo dos excepciones:
- El efecto de los  $\Delta^1$ -derivados no difirió del que produjeron los  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides correspondientes, pese a que en el efecto inhibitorio se observaron algunas diferencias.
- $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2) y su  $\Delta^1$ -derivado (10) no produjeron lisis pese a su notable acción inhibitoria, mientras que en el caso de 11-desoxicorticosterona (4) y su  $\Delta^1$ -derivado (12) la disminución de la viabilidad tampoco resultó la esperada teniendo en

cuenta el efecto inhibitorio que produjeron (causaron más inhibición que 21-desoxicortisol (5) y sin embargo produjeron menor lisis que dicho esteroide).

Estos últimos esteroides son justamente aquellos que ejercieron su acción inhibitoria a la concentración que se ensayó la lisis ( $10^{-4}$  M) en forma no tradicional, pudiendo hallarse ahí la explicación. Por lo tanto los esteroides que ejercen su acción inhibitoria a través del mecanismo a nivel de membrana no producirían lisis. Esto se debería, como se discutiera anteriormente, a que en realidad en estos casos no existiría inhibición de la síntesis de ARN sino que se produce la inhibición del transporte del nucleósido marcado, que se traduce en una menor disponibilidad de este para la síntesis de ARN marcado.

Dado que no se dispone de datos acerca de la acción lítica de los esteroides a menores concentraciones (salvo algunos casos aislados) no fue posible verificar el comportamiento de este parámetro en condiciones en que no se produce el mecanismo no genómico como se realizara en el caso de la inhibición en la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina.

Sin embargo 2 y 10 a concentraciones menores o iguales a  $10^{-5}$  M produjeron lisis celular de acuerdo a su relativamente bajo efecto inhibitorio que llega a un plateau a la concentración mencionada, en concordancia con un aparente efecto irreversible (clásico?) de 10 a una concentración de  $10^{-5}$  M en cuanto a este último efecto.

Concretamente, las conclusiones que es posible extraer del presente estudio acerca de la relación entre la estructura esteroideal y la actividad glucocorticoide son las siguientes:

- Sensibilidad y valor plateau (mecanismo genómico):
- Hidroxilo 11 $\beta$ : aumenta la actividad glucocorticoide, actuando de por sí y no como modulador a través de cambios conformacionales.
- Hidroxilo 17 $\alpha$ : produce un efecto ambiguo en la actividad. En presencia de uno solo de los hidroxilos 11 $\beta$  ó 21 disminuye la actividad, mientras que en presencia de ambos aumenta la actividad glucocorticoide.
- Hidroxilo 21: aumenta la actividad glucocorticoide. El hidroxilo actuaría de por sí y no como modulador de la unión del carbonilo 20 con el receptor, aunque existen ciertas reservas al respecto, como se discutiera anteriormente.
- Doble enlace 1,2: también produce un efecto ambiguo. En presencia del hidroxilo 21 produce aumento o no modifica mayormente la actividad, mientras que en los 21 desoxiesteroideos produce una significativa disminución del efecto analizado.



- Queda totalmente descartada la teoría <sup>13</sup> de que a mayor curvatura esteroideal corresponde mayor actividad glucocorticoide.
- No es posible descartar una curvatura óptima del esteroide. Sin embargo ella no puede ser la única responsable de una determinada actividad, sino que deben estar presentes grupos funcionales característicos (como el hidroxilo 11 $\beta$ ).
- Mecanismo no genómico:
  - Esteroides de baja polaridad (monohidroxiderivados de progesterona).
  - Deben poseer algunos de los hidroxilos característicos de la actividad glucocorticoide (hidroxilos 11 $\beta$  ó 21) que le proporcionan cierta actividad a menores concentraciones.
  - Resultaría particularmente importante la curvatura del esteroide.  $\Delta^1$ -11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (10), el más curvado del grupo, fue el que más se apartó del mecanismo clásico mediado por receptores.
- Lisis celular:
  - Doble enlace 1,2 : no afecta la actividad, aunque produzca diferencias en cuanto a la inhibición en la incorporación de <sup>3</sup>H-uridina a ARN, lo cual implica una disociación de efectos aún en el caso del

mecanismo genómico.

- Hidroxilos  $11\beta$ ,  $17\alpha$  y  $21$ : importancia similar a las observadas en la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina salvo en los casos en que el esteroide no sigue el mecanismo clásico a la concentración ensayada ( $10^{-4}$  M).
- En los esteroides que presentan el mecanismo no genómico de inhibición, el efecto lítico desaparece (2 y 10) o resulta considerablemente menor (4 y 12) a su acción inhibitoria sobre la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina.

CAPITULO VI  
PARTE EXPERIMENTAL

## PARTE EXPERIMENTAL

### VI.1. Generalidades:

Los puntos de fusión (Pf) fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN- $^1\text{H}$ ) y de  $^{13}\text{C}$  (RMN- $^{13}\text{C}$ ) se realizaron a 100 y 25,2 MHz respectivamente en un espectrómetro Varian XL-100-15, operando por pulsos y transformadas de Fourier, con una computadora 620/L-100 y una unidad de discos magnéticos Sykes-7000.

Se utilizó  $\text{CDCl}_3$  como solvente, excepto en los casos en que se indica lo contrario. En todas las determinaciones se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto del TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Las señales en RMN- $^1\text{H}$  se indican en cada caso como s (singulete), d (doblete), t (triplete), dd (doble doblete), c (cuarteto), m (multiplete), ba (banda ancha). Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  se obtuvieron en tubos de 5 mm aplicando pulsos de  $90^\circ$  y un tiempo de repetición de 4,7 segundos sobre un ancho espectral de 1500 Hz. Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  se midieron en tubos de 12 mm aplicando pulsos de  $70^\circ$  con un tiempo de repetición de 2,2 segundos, o en tubos de 5 mm aplicando pulsos de  $45^\circ$  con un tiempo de repetición de 0,7 segundos sobre un ancho espectral de 5400 Hz.

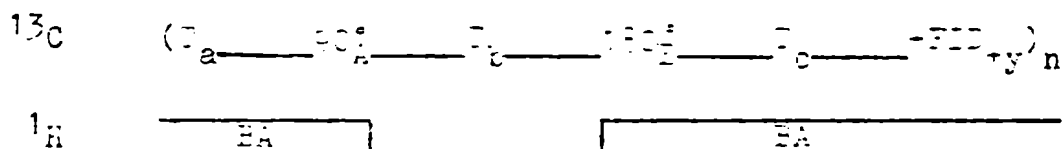
Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplados de  $^1\text{H}$

se obtuvieron por irradiación de los  $^1\text{H}$  a una frecuencia central correspondiente a 4 ppm modulada por un barrido de onda cuadrada.

Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  con irradiación selectiva fuera de resonancia (SFORD) se obtuvieron por irradiación de los  $^1\text{H}$  a una frecuencia única correspondiente a -4, 0 ó 10 ppm.

Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  totalmente acoplados a  $^1\text{H}$  con efecto nuclear Overhauser, se obtuvieron como los totalmente desacoplados pero apagando el desacoplador durante el período de adquisición de datos.

Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$ -APT fueron obtenidos por el método de ecos de spin con desacople alternado según el siguiente esquema:



A	B	FID <sub>+y</sub>
+x	+y	+
-x	-y	-
+x	-y	+
-x	+y	-

Los espectros de masas (e.m.) se realizaron a 70 eV en un espectrómetro de masas Varian-Mat-CH-7A, comandado por una computadora Varian-Mat-Data-System 160 usando una teletipo Tektronix 4010-1 y un impresor Tektronix 4631, por inserción directa de la muestra.

Las cromatografías gas-líquido acopladas con espectrometría de masas (cgl-em) se realizaron con un cromatógrafo gaseoso Varian 1440 acoplado al espectrómetro de masas antes mencionado, utilizando una columna de vidrio (1,8 m x 2 mm de diámetro interno) de fase OV-17 3% sobre Chromosorb.

Las cromatografías gas-líquido (cgl) fueron realizadas en un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard 5830-A con detector de ionización de llama, equipado con una columna capilar de sílica fundida (12 m x 0,02 mm de diámetro interno) revestida con metilsilicona (Hewlett-Packard) desarrolladas con temperatura programada entre 170 y 280°C a una velocidad de 4°C/minuto.

La cromatografía líquida de alta resolución (clar) analítica se realizó en un cromatógrafo líquido Hewlett-Packard 1084 con detector de índice de refracción e inyector automático de volumen variable. Se utilizaron dos columnas en serie (500 y 250 mm de largo, 3,6 mm de diámetro interno) rellenas con Lichrosorb RP-18 10  $\mu$ , metanol:agua (95:5) como eluyente y un flujo de 2 ml/minuto.

La cromatografía líquida de alta resolución preparativa fue realizada en un cromatógrafo líquido Micromeritics equipado con inyector manual (modelo 730) y detector de índice de refracción. Las separaciones se realizaron en una columna Alltech R-SIL C-18HL (500 mm de largo x 10 mm de diámetro interno) con metanol como solvente de elución a un flujo de 8 ml/minuto, o en una columna Altex Ultrasphere ODS (250 mm de largo x 10 mm de diámetro interno) con metanol:agua (95:5) como solvente de elución a un flujo de 4 ml/minuto.

Las cromatografías en capa delgada (ccd) analíticas se

realizaron utilizando como fase fija silicagel: Alugram Nano-SIL G/UV<sub>254</sub> y Alugram SIL G/UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel Düren), ó alúmina: Polygram ALOX N/UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel Düren).

En el texto ccd se refiere a cromatografía en capa delgada de silicagel salvo donde se especifique lo contrario.

Los reveladores para ccd utilizados fueron: 1) vapores de I<sub>2</sub>, 2) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 %) y calentamiento a 105°C, 3) Observación a luz UV a 254 nm.

Las cromatografías en capa delgada preparativa se realizaron en silicagel GF/254 ó PF/254 (Merck) ó alúmina GF/254 (Merck), sobre placas de vidrio, observándolas luego del desarrollo a la luz UV a 254 nm.

Los solventes de desarrollo utilizados en ccd, tanto analíticos como preparativa, fueron: 1) hexano, 2) hexano:tolueno (5:2), 3) benceno ó tolueno, 4) benceno:acetato de etilo ó tolueno:acetato de etilo en distinta proporción (se especifica en cada caso), 5) acetato de etilo. Se utilizó la técnica ascendente. Siempre se obtuvo mejor resolución con las mezclas de solventes que contenían benceno que con aquellas que contenían tolueno, pero dada la toxicidad del primero se utilizó en general el segundo salvo imperiosa necesidad.

Las cromatografías en columna (cc) se realizaron utilizando como adsorbente silicagel grado 923, malla 200-300 (Davidson Chemical), silicagel H (Merck) y alúmina neutra (Woelm). Las columnas de silicagel H (tamaño de partícula: 10-40 micrones) fueron eluidas bajo presión utilizando aire comprimido.

En el texto cc se refiere a cromatografía en columna de

silicagel salvo donde se especifique lo contrario.

Los solventes fueron purificados por destilación y evaporados a presión reducida a menos de 50°C en Rotavapor-R (Buchi).

Las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volúmenes (v:v).



## VI.2. Síntesis de pregnanesteroides:

### VI.2.1. $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2).

A una solución de corticosterona (6) (400 mg) en piridina seca (4 ml) enfriada a  $0^{\circ}\text{C}$  se le agregó, con agitación, cloruro de metanosulfonilo (0,4 ml). Luego de 3 hs a  $0^{\circ}\text{C}$  se volcó en agua fría y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con agua, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtró y se evaporó el solvente.

El compuesto obtenido (27) se disolvió en una solución de  $\text{IKa}$  (4 g) en ácido acético glacial (60 ml) y se dejó con agitación a temperatura ambiente. Luego de 24 hs la solución se volcó en una solución acuosa de  $\text{NaHSO}_3$  (10 %) y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con agua, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtró y se evaporó el solvente.

El producto crudo se purificó por cc ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como solvente) obteniéndose  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (320 mg) homogéneo en ccd (solvente 4 (1:1)), Pf  $137-8^{\circ}\text{C}$  (Lit.:  $135-7^{\circ}\text{C}$ ) <sup>162</sup>, idéntico espectroscopicamente (RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ , descriptos en las tablas III-9, pág. 181, y III-12, pág. 205, respectivamente) a una muestra auténtica.

### VI.2.2. 11-desoxicorticosterona (4).

Se disolvió progesterona (1) (1 g) en tetrahidrofurano (5 ml) y metanol (3,2 ml). La solución se enfrió a  $0^{\circ}\text{C}$  y se agregó  $\text{CaO}$  (1,5 g). A la mezcla se le agregó luego  $\text{I}_2$  (1,5 g) disuelto en

tetrahidrofurano (2,5 ml), metanol (0,8 ml) y  $\text{CaCl}_2$  (0,2 ml de una solución acuosa 500 g/litro) y se calentó a 10-15°C. Luego de 3 hs a esa temperatura, se diluyó la solución con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 ml), se filtró y se volvió a diluir, esta vez con éter etílico (150 ml).

La solución resultante se lavó con  $\text{HNa}$  (solución acuosa al 15 %) y se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro. Por evaporación del solvente se obtuvo 21-iodo-progesterona (22) que se utilizó inmediatamente.

La  $\alpha$ -iodocetona se disolvió en acetona (50 ml) y se le agregó una mezcla de ácido acético (17,2 ml) y trietilamina (26,3 ml). La solución se calentó a reflujo 45', se enfrió y se volcó en agua-hielo (125 ml). El producto se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente.

El producto acetato resultante se disolvió en metanol (65 ml) y se agregó  $\text{NaHSO}_3$  (15 ml de solución acuosa al 10 %). La solución se calentó a reflujo 1 hora, se concentró a presión reducida y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con agua, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se llevó a sequedad a presión reducida.

El producto obtenido (21-acetoxiprogesterona (25)) fue hidrolizado mediante el siguiente procedimiento: se disolvió el esteroide en metanol (10 ml) y se agregó  $\text{NaOH}$  (2 ml de solución acuosa al 10 %) a temperatura ambiente bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . Luego de 10' se volcó en agua (50 ml) y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto resultante se purificó por cc ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :acetato de etilo como eluyente) obteniéndose 11-decoxicorticosterona (4) (580 mg) homogéneo en ccd

(solvente 4 (1:1)), Pf 142-3°C (Lit.: 141,5-2,5°C) <sup>163</sup>, idéntico espectroscopicamente (RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C, descriptos en las tablas III-9, pág. 181, y III-12, pág. 205, respectivamente) a una muestra auténtica.

#### VI.2.3. 21-desoxicortisol (5).

Utilizando la secuencia de síntesis detallada en el caso de 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (2) en el punto VI.2.1. pero partiendo de cortisol (8) (100 mg) se obtuvo 21-desoxicortisol (5) (68 mg), Pf 227-8°C (Lit.: 226-8°C) <sup>163</sup>, idéntico espectroscopicamente (RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C, descriptos en las tablas III-9, pág. 181, y III-12, pág. 205, respectivamente) a una muestra auténtica.

#### VI.2.4. Cortexolona (7).

En este caso se aplicó la secuencia de 21-hidroxilación, indicada en VI.2.2., a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) (100 mg). La única diferencia con la secuencia detallada es que no se realizó el tratamiento con NaHSO<sub>3</sub>. Se obtuvo así cortexolona (7) (60 mg), Pf 203-4°C (Lit.: 200-5°C) <sup>164</sup>, idéntico espectroscopicamente (RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C, descriptos en las tablas III-9, pág. 181, y III-12, pág. 205, respectivamente) a una muestra auténtica.

#### VI.2.5. Pregna-1,4-dien-3,20-diona (9).

Progesterona (1) (24 mg) y 2,3-diciano-5,6-dicloro-benzo

quinona (DDQ) <sup>39</sup> (1,3-1,5 equivalentes) en benceno anhidro (2 ml) se calentaron a reflujo durante 24 hs.

Luego de enfriar, la solución resultante se pasó por una columna de alúmina neutra, eluyendo con acetato de etilo, obteniéndose el producto libre de reactivo (DDQ) y de la hidroquinona formada en la reacción. Este se purificó por recristalización de acetato de etilo/hexano, dando lugar a  $\Delta^1$ -progesterona (2) (18 mg) homogénea en ccd (solvente 4 (2:1)), Pf 151-2°C (Lit.: 152-3°C) <sup>165</sup>, caracterizada por e.m. (Tabla III-2, pág. 154), RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-9, pág. 181) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-12, pág. 205).

#### VI.2.6. 11 $\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10).

i. Método A: se realizó la oxidación de 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (2) (120 mg) con DDQ, de acuerdo al método general indicado en VI.2.5. El producto crudo fue purificado por recristalización de acetato de etilo/hexano, obteniéndose 11 $\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (10) (96 mg), Pf 241-3°C (Lit.: 242-3°C) <sup>46</sup>, caracterizado por e.m. (Tabla III-2, pág. 154), RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-9, pág. 181) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-12, pág. 205).

ii. Método B: se empleó la misma reacción del método A salvo que se partió de 11 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregna-3,20-diona (31) (120 mg), utilizándose una mayor proporción de DDQ (210 mg). El producto obtenido se purificó por cc (silicagel H, tolueno:acetato de etilo como solvente) y recristalización de acetato de etilo/hexano, obteniéndose  $\Delta^1$ -11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (10) (90 mg) cuyas caracte-

rísticas espectroscópicas (e.m., RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ ) y Pf coincidieron con los del producto obtenido por el método A.

#### VI.2.7. 17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (11).

i. Método A: 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) (501 mg) fue oxidado con

DDQ según se indica en VI.2.5., purificándose el producto resultante por recristalización de acetato de etilo/hexano. Se obtuvo así 17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (11) (452 mg), Pf 248-51°C (Lit.: 245-62°C) <sup>44</sup>, caracterizado por e.m. (Tabla III-2, pág. 154), RMN- $^1\text{H}$  (Tabla III-9, pág. 181) y RMN- $^{13}\text{C}$  (Tabla III-12, pág. 205).

ii. Método B: se disolvió 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) (20 mg) en

ácido acético glacial (2 ml). Se agregó ácido p-toluensulfónico (20 mg) y anhídrido acético (0,4 ml) y se dejó la solución a temperatura ambiente durante 48 hs. Al cabo de ese tiempo se volcó la solución en  $\text{NaHCO}_3$  (20 ml de solución acuosa al 10 %) y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente. La 17 $\alpha$ -acetoxiprogesterona (39) (21 mg) obtenida, de consistencia aceitosa, homogénea por ccd (solvente 4 (2:1)), fue oxidada con DDQ en las condiciones generales mencionadas en VI.2.5., obteniéndose el  $\Delta^1$ -derivado correspondiente (40) (19 mg), homogéneo por ccd (solvente 4 (2:1)). Finalmente el producto anterior fue hidrolizado disolviendo el mismo en etanol (30 ml) y agregando  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7 ml de solución acuosa 3 mg/ml). La mezcla de reacción se calentó a re-

flujo. Luego de 24 hs se volcó en agua (75 ml), se neutralizó con ácido acético y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con agua, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente. La recrystalización de acetato de etilo/hexano produjo 17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (11) (16 mg) cuyas características espectroscópicas (e.m., RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ ) y Pf coincidieron con las del producto obtenido por el método A.

iii. Método C: Se disolvió 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) (500 mg) en ácido fórmico (6 ml) y se agregó ácido p-toluensulfónico (60 mg). La solución resultante se dejó a temperatura ambiente 48 hs. La mezcla de reacción se volcó en agua (60 ml) y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente.

El esteroide formilado (45) obtenido (535 mg), homogéneo por ccd (solvente 4 (2:1)) fue oxidado con DDQ en las condiciones generales detalladas en VI.2.5., aislándose el  $\Delta^1$ -derivado correspondiente (46) (330 mg), homogéneo por ccd (solvente 4 (2:1)).

Finalmente el producto anterior fue hidrolizado disolviendo el mismo en metanol (50 ml) y agregando KOH (6,5 ml de solución acuosa al 1 %). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente. Luego de 24 hs se neutralizó con ácido acético, se concentró y se volcó en agua. Se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con agua, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se evaporó el solvente a presión reducida, y se purificó por recrystalización de acetato de etilo/hexano, obteniéndose 17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (11) (250 mg) cuyas características espectroscópicas (e.m., RMN- $^1\text{H}$

y RMN- $^{13}\text{C}$ ) y Pf coincidieron con las del producto obtenido por el método A.

#### VI.2.8. 21-hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (12).

Se disolvió 11-desoxicorticosterona (4) (393 mg) en piridina seca (8 ml) y se agregó anhídrido acético (8 ml), dejándose la solución a temperatura ambiente. Luego de 24 hs se volcó en HCl acuoso (8 ml de HCl concentrado + 80 ml de agua) y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida.

La 21-acetoxiprogesterona (25) obtenida (360 mg), homogénea en ccd (solvente 4 (3:1)), fue oxidada con DDQ en las condiciones generales indicadas en VI.2.5. aislándose el  $\Delta^1$ -derivado correspondiente (52) (279 mg) impurificado con una pequeña cantidad de 25 (determinado por ccd).

Finalmente la mezcla anterior fue hidrolizada disolviendo la misma en etanol (20 ml) y agregando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2 gotas). La solución resultante se calentó a reflujo. Luego de 36 hs se volcó en agua (140 ml) y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente. Por cc (benceno:acetato de etilo como solvente de elución) se obtuvo 21-hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (12) (222 mg) que se recristalizó de acetato de etilo/hexano. Pf 202-4°C (Lit.: 203-4°C) <sup>166</sup>. El producto se caracterizó por e.m. (Tabla III-2, pág. 154), RMN- $^1\text{H}$  (Tabla III-9, pág. 181) y RMN- $^{13}\text{C}$  (Tabla III-12, pág. 205).

La hidrólisis del acetato 52 también se llevó a cabo en las condiciones indicadas en VI.2.2. obteniéndose iguales resultados que en la secuencia anterior.

#### VI.2.9. $11\beta,17\alpha$ -dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (13).

i. Método A: Utilizando la secuencia de síntesis detallada en VI.

2.1. para la eliminación del hidroxilo-21, partiendo de prednisona (15) (100 mg) se obtuvo  $11\beta,17\alpha$ -dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (13) (64 mg), Ff 258-60°C (Lit.: 258-9°C) <sup>167</sup>, caracterizado por e.r. (Tabla III-2, pág. 154), RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-9, pág. 131) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-12, pág. 205).

ii. Método B: Se disolvió 21-desoxicortisol (5) (7 mg) en benceno

anhidro (2 ml) y se agregó DDQ (7 mg), calentándose la solución a reflujo durante 24 hs. Se recuperó el esteroide de partida sin reaccionar (analizado por RMN-<sup>1</sup>H).

La reacción se repitió utilizando un gran exceso de DDQ (5 equivalentes) y prolongando el tiempo de calentamiento a 48 hs, lográndose una conversión en el  $\Delta^1$ -derivado (13) del 20 % (el producto solo se analizó por RMN-<sup>1</sup>H (figura 8, pág 39)).

iii. Método C: 21-desoxicortisol (5) (21 mg) fue acetilado en las

condiciones ácidas indicadas en el punto VI.2.7.ii.. El producto obtenido, analizado por ccđ (solvente 4 (1:1)) presentó dos manchas (de similar intensidad y  $R_f$  mayor que 5), correspondientes a un mono (41) y el diacetato (42) del esteroide de partida. La mez



cla fue oxidada con DDQ en las condiciones generales detalladas en VI.2.5. obteniéndose una mezcla de cuatro productos correspondientes a los mono y diacetatos de 21-desoxicortisol y su  $\Delta^1$ -derivado. La mezcla fue sometida a las condiciones de hidrólisis ácida detalladas en VI.2.6. produciéndose la desaparición de los compuestos de mayor  $R_f$  (diacetatos 42 y 44), quedando solo los dos esteroides de menor  $R_f$  (41 y 43). Finalmente la hidrólisis básica en las condiciones descritas en VI.2.7.ii. produjo 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (13) (17 mg) impurificada con el esteroide de partida (5) (25 %). La mezcla, sin separar, fue caracterizada por RMN- $^1\text{H}$  coincidiendo con los espectros de los constituyentes correspondientes.

iv. Método 2: 21-desoxicortisol (5) (40,5 mg) fue formilado en las condiciones indicadas en VI.2.7.iii. obteniéndose un producto (41 mg) homogéneo por ccd (solvente 4 (1:1)).

RMN- $^1\text{H}$ . ppm: 0,91 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 1,30 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 2,25 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -21), 5,65 (m, 1H, H-11 $\alpha$ ), 5,69 (ba, 1H, H-4), 8,04 (s, 1H,  $\text{HCO}_2\text{R}$ ).

El compuesto anterior fue oxidado con DDQ en las condiciones generales indicadas en VI.2.5., obteniéndose un producto principal acompañado de una pequeña cantidad del formil derivado de partida, analizado por ccd (solvente 4 (1:1)), hidrolizándose esta mezcla en las condiciones básicas detalladas en VI.2.7.iii.. De la mezcla final de reacción se purificó, por cc (benceno:etanol como solvente de elución) y recristalización de acetato de etilo/hexano, 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (13) (13 mg) coinciden

te espectroscópicamente (e.m., RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ ) con el producto obtenido por el método A.

v. Método E: a una solución de trietilamina anhidra (4 ml) en éter etílico anhidro (12 ml) se agregó cloruro de metoxietoximetilo (MEMCl) (2,4 ml) y se dejó a temperatura ambiente. Luego de 17 hs se decantó el precipitado formado, cloruro de trietil(metoxietoximetil)amonio (MEMNEt<sub>3</sub>Cl), descartándose la fase etérea. El precipitado se disolvió en acetonitrilo anhidro (20 ml) y se agregó 21-deoxicortisol (5) (140 mg). La solución se calentó a reflujo. Luego de 4 hs se volcó la mezcla de reacción en agua (25 ml) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el solvente. El producto obtenido (49) (160 mg) resultó homogéneo por cc (solvente A (1:1)). El análisis por RMN- $^1\text{H}$  indicó la presencia de compuestos de tipo MEM, por lo cual se procedió a purificar el producto por cc (benceno:acetato de etilo), obteniéndose el esteroide protegido en forma pura (60 mg).

RMN- $^1\text{H}$ . ppm: 0,98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 1,44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 2,2<sup>o</sup> (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 3,38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-MEMOR), 3,40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-MEMOR), 3,56 (dd, J=6 y 3 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-MEMOR), 3,72 (dd, J=6 y 3 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-MEMOR), 4,26 (m, 1H, H-11 $\alpha$ ), 4,77 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-MEMOR), 4,85 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-MEMOR), 5,69 (ba, 1H, H-4).

49 fue oxidado con DDQ en las condiciones generales indicadas en VI.2.5., obteniéndose una mezcla del  $\Delta^1$ -derivado correspondiente (50) (principal) y del esteroide sin reaccionar, analizado por cc (solvente A (1:1)). Esta mezcla se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco

(el menor volumen necesario) (0,5 ml) y se agregó igual volumen de  $\text{TiCl}_4$ . La solución resultante se dejó 30' a temperatura ambiente bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . Al cabo de ese tiempo se volcó en  $\text{NH}_4\text{OH}$  (solución acuosa saturada) (100 ml) y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con  $\text{HCl}$  diluido (solución al 1 %) y luego agua hasta neutralidad, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente, obteniéndose 24 mg de una mezcla de  $\Delta^1$ -21-desoxicortisol (13) y el esteroide de partida (5) (85:15), la cual se resolvió por ccd preparativa (alúmina, tolueno:acetato de etilo (3:2) desarrollado 3 veces). Las bandas correspondientes se cortaron, se colocaron en columnas cromatográficas y se eluyeron con acetato de etilo. Las características espectroscópicas (e.m., RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ ) y Pf de 13 así obtenido coincidieron con las del producto sintetizado por el método A.

#### VI.2.10. $11\beta$ ,21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (14).

Corticosterona (6) (300 mg) fue acetilada utilizando el método indicado en VI.2.8. obteniéndose el 21-acetato correspondiente (51) (340 mg) homogéneo por ccd (solvente 5). El compuesto acetilado así obtenido se oxidó con DDQ en las condiciones generales detalladas en VI.2.5.. Esta reacción dio lugar a un producto levemente amarillo (280 mg), formado principalmente por el  $\Delta^1$ -derivado correspondiente (53), analizado por ccd (solvente 5), el cual fue sometido a la hidrólisis ácida descrita en VI.2.8.. El producto resultante se purificó por cc (benceno:acetato de etilo) y recristalización de acetato de etilo/hexano obteniéndose  $11\beta$ ,21-dihidroxi-

pregna-1,4-dien-3,20-diona (14) (240 mg), Pf 226-3°C (Lit.: 227-30°C) <sup>163</sup>, caracterizado por e.m. (Tabla III-2, pág. 154), RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-9, pág. 181) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-12, pág. 205).

VI.2.11. 17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (15).

i. Método A: aplicando la secuencia de reacciones de 21-hidroxilación detallada en VI.2.2. sobre 17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (11) (460 mg) se obtuvo 17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (15) (250 mg), Pf 240-1°C (Lit.: 234-42°C) <sup>169</sup>, caracterizado por e.m. (Tabla III-2, pág. 154), RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-9, pág. 181) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-12, pág. 205).

ii. Método B: se disolvió cortexolona (2) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2,5 ml) y se agregó formalina (1 ml de solución al 36,21 % p/v) y HCl concentrado (1 ml). Luego de 50 hs a temperatura ambiente se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las fases orgánicas se juntaron, se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> (solución saturada) y luego agua hasta neutralidad, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el solvente. El producto obtenido (51 mg), homogéneo por ccd (solvente 5), fue oxidado con DDQ en las condiciones detalladas en VI.2.5., obteniéndose un producto homogéneo por ccd (solvente 5) de R<sub>f</sub> menor que el compuesto anterior, como era de esperarse de producirse la oxidación.

Finalmente se ensayaron distintas condiciones de hidrólisis (ácido fórmico al 60 % a 105°C; ácido acético al 50 % a 90°C, ambos bajo corriente de N<sub>2</sub>, entre 15' y 24 hs) produciéndose en to

dos los casos la descomposición del esteroide, no analizándose mayormente el producto obtenido.

iii. Método C: de una solución de cortexolona (2) (250 mg) y ácido p-toluensulfónico (0,6 mg) en benceno anhidro (100 ml) se destilaron 10 ml de solvente. Se agregó dietilacetal de benzaldehído <sup>61</sup> (0,8 ml) y se continuó destilando durante 30' (aproximadamente 65 ml de solvente). Se dejó enfriar la solución y se neutralizó con piridina. Se evaporó el solvente a presión reducida. El residuo resultante (aceite) se purificó por cc (benceno:acetato de etilo), obteniéndose un producto homogéneo por ccd (alúmina, solvente 3) correspondiente al 17 $\alpha$ ,21-bencilidendioxi derivado de cortexolona. RMN-<sup>1</sup>H. ppm: 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18, 57-a), 0,84 (s, 3H/5, CH<sub>3</sub>-18, 57-b), 1,19 (s, 3H+3H/5, CH<sub>3</sub>-19, 57-a-57-b), 4,20 y 4,30 (d, J=6 Hz, 2H/5, CH<sub>2</sub>-21, 57-b), 4,36 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-21, 57-a), 5,69 (ba, 1H+1H/5, H-4, 57-a + 57-b), 5,76 (s, 1H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHO<sub>2</sub>R<sub>2</sub>, 57-a), 6,08 (s, 1H/5, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CHO<sub>2</sub>R<sub>2</sub>, 57-b), 7,30 (m, 5H+5H/5, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 57-a + 57-b).

El producto anterior fue sometido a las condiciones generales de oxidación con DDQ indicadas en VI.2.5., obteniéndose una mezcla del  $\Delta^1$ -esteroide (58) y del producto sin reaccionar, los cuales fueron separados por cc (benceno:acetato de etilo), aislándose el 17 $\alpha$ -21-bencilidendioxi derivado de  $\Delta^1$ -cortexolona (58) en forma pura.

RMN-<sup>1</sup>H. ppm: 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18, 58-a), 0,83 (s, 3H/5, CH<sub>3</sub>-18, 58-b), 1,25 (s, 3H+3H/5, CH<sub>3</sub>-19, 58-a+58-b), 4,20 y 4,30 (d, J=6 Hz, 2H/5, CH<sub>2</sub>-21, 58-b), 4,38 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-21,

58-a), 5,78 (s, 1H,  $C_6H_5CHO_2R_2$ , 58-a), 6,07 (ba, 1H + 1H/5, H-4, 58-a + 58-b), 6,09 (s, 1H/5,  $C_6H_5CHO_2R_2$ , 58-b), 6,23 (dd,  $J=10$  y  $2$  Hz, 1H+1H/5, H-2, 58-a + 58-b), 7,02 (d,  $J=10$  Hz, 1H+1H/5, H-1, 58-a + 58-b), 7,35 (m, 5H+5H/5,  $C_6H_5$ , 58-a + 58-b).

58 se disolvió en metanol (6 ml) y se le agregó HCl (una gota de solución 1 N). La solución se calentó a reflujo durante 15', se enfrió a temperatura ambiente y se volcó en agua (54 ml). Se extrajo con  $CH_2Cl_2$ . La fase orgánica se lavó con agua hasta neutralidad, se secó con  $MgSO_4$  anhidro y se evaporó el solvente.

17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (15) se aisló por cc y se recrystalizó de acetato de etilo, resultando idéntico (Pf, e.m., RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$ ) al obtenido por el método A.

iv. Método D: cortexolona (7) (51 mg) fue acetilada en las condiciones ácidas detalladas en VI.2.7., obteniéndose una mezcla (60 mg) de los derivados mono y di acetilados, analizada por ccd (solvente 4 (1:1)). La misma fue oxidada con DDQ en las condiciones generales indicadas en VI.2.5..

El producto obtenido (40 mg) fue sometido a las condiciones de hidrólisis ácidas (descripta en VI.2.8.) ó básicas (detalladas en VI.2.7.ii.) produciéndose en ambos casos la descomposición del esteroide.

En el caso de la hidrólisis ácida el producto obtenido fue identificado como 21,21-dietoxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona y su 1,2-dihidroanálogo.

RMN- $^1\text{H}$ . ppm: 0,70 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18,  $\Delta^4$ -esteroide), 0,73 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18,  $\Delta^{1,4}$ -esteroide), 1,20 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19,  $\Delta^4$ -esteroide), 1,24 (t,  $J=6$  Hz, 2x6H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 1,26 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19,  $\Delta^{1,4}$ -esteroide), 3,57 (c,  $J=6$  Hz, 2x2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 3,63 (c,  $J=6$  Hz, 2x2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 4,54 (d,  $J=2$  Hz, 2x2H,  $\text{CH}_2$ -21), 5,74 (ba, 1H, H-4,  $\Delta^4$ -esteroide), 6,09 (ba, 1H, H-4,  $\Delta^4$ -esteroide), 6,25 (dd,  $J=2$  y 10 Hz, 1H, H-2,  $\Delta^{1,4}$ -esteroide), 7,07 (d,  $J=10$  Hz, 1H, H-1,  $\Delta^{1,4}$ -esteroide).

v. Método E: cortexolona (7) (30 mg) fue protegido por formación del MEM-derivado en las condiciones indicadas en VI.2.9.v.. El producto crudo se oxidó con DDQ en las condiciones detalladas en VI.2.5., obteniéndose el  $\Delta^1$ -derivado esperado, impurificado con una pequeña cantidad del esteroide sin oxidar del cual se separó por cc.

RMN- $^1\text{H}$ . ppm: 0,74 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 1,24 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 3,38 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -MEMOR), 3,56 (dd,  $J=6$  y 3 Hz, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ -MEMOR), 3,72 (dd,  $J=6$  y 3 Hz, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ -MEMOR), 4,32 (d,  $J=20$  Hz, 1H,  $\text{CH}_A$ -21), 4,70 (d,  $J=20$  Hz, 1H,  $\text{CH}_B$ -21), 4,78 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -MEMOR), 4,83 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ -MEMOR), 6,08 (ba, 1H, H-4), 6,25 (dd,  $J=10$  y 2 Hz, 1H, H-2), 7,05 (d,  $J=10$  Hz, 1H, H-1).

La eliminación del protector se realizó como se describe en VI.2.9.v., resolviéndose la mezcla obtenida por cc (benceno: acetato de etilo), obteniéndose  $\Delta^1$ -cortexolona (15) (15 mg) idéntico (Pf, e.m., RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ ) al producto obtenido por el método A.

VI.2.12.  $11\beta,17\alpha,21$ -trihidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (16).

La reacción de  $\text{MEMEt}_3\text{Cl}$  con cortisol (3) (36 mg) en acetonitrilo se llevó a cabo en las condiciones generales mencionadas en VI.2.9.v.. El producto resultante (50 mg) se identificó como el triMEM-derivado de cortisol (65).

RMN- $^1\text{H}$ . ppm: 0,94 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 1,44 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 3,40 (m, 9H,  $\text{CH}_3$ -MEMOR), 3,64 (dd,  $J=6$  y 3 Hz, 12H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ -MEMOR), 4,26 (m, 1H, H-11 $\alpha$ ), 4,40 (d,  $J=20$  Hz, 1H,  $\text{CH}_A$ -21), 4,70 (d,  $J=20$  Hz, 1H,  $\text{CH}_B$ -21), 4,76 (s, 3H,  $\text{CH}_2$ -MEMOR), 4,77 (s, 3H,  $\text{CH}_2$ -MEMOR), 4,83 (s, 3H,  $\text{CH}_2$ -MEMOR), 5,67 (ba, 1H, H-4).

El cortisol así protegido fue oxidado con DDQ (según VI.2.5.), lográndose la oxidación parcial del esteroide (75 % de conversión). Finalmente la desprotección se realizó en las condiciones detalladas en VI.2.9.v., purificándose el producto por ccd preparativa (solvente 4 (1:1)). Se obtuvo prednisolona (16) (10 mg), idéntica espectroscópicamente (e.m., RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ , descriptos en las tablas III-2, pág. 154, III-9, pág. 181, y III-12, pág. 205, respectivamente) a una muestra auténtica.

VI.2.13.  $2,2,4,6,6,17,21,21,21$ -d $_9$ -pregn-4-en-3,20-diona (69).

A una solución de progesterona (1) (200 mg) en  $\text{CH}_3\text{OD}$  (4 ml) se le agregó  $\text{CH}_3\text{ONa}$  (30 mg) en  $\text{CH}_3\text{OD}$  (1 ml). La solución se dejó a 25°C bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  durante 70 hs.

Luego de ese tiempo, se evaporó el solvente a presión re



ducida y el residuo se tomó con éter etílico. La solución etérea se lavó con agua, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente, obteniéndose 2,2,4,6,6,17,21,21,21- $\text{d}_9$ -progesterona (69) (200 mg) (15 %  $\text{d}_9$ , 37 %  $\text{d}_8$ , 30 %  $\text{d}_7$ , 14 %  $\text{d}_6$ , 4 %  $\text{d}_5$  determinado por e.m.), cuyo espectro RMN- $^{13}\text{C}$  se presenta en la figura 65 (pág. 207).

VI.2.14. 4,6,6,17,21,21,21- $\text{d}_7$ -pregna-1,4-dien-3,20-diona (70).

Aplicando el método anterior (VI.2.13.) sobre  $\Delta^1$ -progesterona (2) (100 mg) se obtuvo 4,6,6,17,21,21,21- $\text{d}_7$ - $\Delta^1$ -progesterona (70) (94 mg) (4 %  $\text{d}_7$ , 28 %  $\text{d}_6$ , 29 %  $\text{d}_5$ , 24 %  $\text{d}_4$ , 10 %  $\text{d}_3$ , 3 %  $\text{d}_2$  determinado por e.m.), cuyo espectro RMN- $^{13}\text{C}$  se presenta en la figura 66 (pág. 209).

VI.2.15. 4,6,6,21,21,21- $\text{d}_6$ -17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona (71).

Se realizó el intercambio isotópico por deutерación de los hidrógenos intercambiables en  $\Delta^1$ -17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (11) (52 mg) en las condiciones indicadas en VI.2.13., obteniéndose 4,6,6,21,21,21- $\text{d}_6$ - $\Delta^1$ -17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (71) (50 mg) (5 %  $\text{d}_6$ , 30 %  $\text{d}_5$ , 17 %  $\text{d}_4$ , 42 %  $\text{d}_3$ , 6 %  $\text{d}_2$  determinado por e.m.). En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del mismo se observó la desaparición de las señales correspondientes a C20 y C21, y la disminución de la intensidad de las señales de C6 y C4.

VI.2.16. 2,2,4,6,6-d<sub>5</sub>-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihidrovi-pregn-4-en-3,20-diona (71).

Se disolvió cortisol (8) (300 mg) en diglima seca (10 ml) y se agregó DCl (1 ml de solución 0,5 N en D<sub>2</sub>O). Luego de 16 hs a temperatura ambiente bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, se volcó la solución en agua-hielo y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el solvente.

El producto obtenido (190 mg) resultó ser homogéneo por ccd (solvente 4 (1:1)). Por RMN-<sup>13</sup>C (figura 22, pág. 67) se observó la deuteración parcial del esteroide por lo cual se repitió la operación de deuteración pero prolongando el tiempo de intercambio a 70 hs. Luego de ese tiempo, se evaporó el solvente a presión reducida y el residuo se lavó con agua y hexano. El análisis por ccd del mismo indicó la presencia de cortisol, impurificado con dos sustancias de mayor R<sub>f</sub>. El compuesto deseado se purificó por cc (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:metanol) obteniéndose 2,2,4,6,6-d<sub>5</sub>-cortisol (73) (120 mg) (1 % d<sub>7</sub>, 2 % d<sub>6</sub>, 19 % d<sub>5</sub>, 43 % d<sub>4</sub>, 27 % d<sub>3</sub>, 7 % d<sub>2</sub>, 1 % d<sub>1</sub> determinado por e.m.), cuyo espectro RMN-<sup>13</sup>C se presenta en la figura 22 (pág. 67).

VI.2.17. Pregna-1,4,6-trien-3,20-diona (76).

Pregnenolona (110 mg) y DDQ (264 mg) se disolvieron en dioxano (4 ml). La solución se calentó a reflujo durante 24 hs. Al cabo de ese tiempo se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 ml). La solución resultante se pasó por una columna de alúmina neutra (2 g) eluyéndose con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:ace

tona (4:1).

Se obtuvo un producto cristalino levemente amarillento compuesto por una mezcla de pregna-1,4,6-trien-3,20-diona (76) y pregnenolona (75) en relación 2:1 (102 mg). El compuesto deseado fue purificado por cc (benceno)(rend: 65 mg), Pf 151-3 C (Lit.: 152-4°C) <sup>70</sup>, confirmándose su estructura por RMN-<sup>1</sup>H.

RMN-<sup>1</sup>H. (CDCl<sub>3</sub>). ppm: 0,75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 1,21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 2,15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 6,02 (ba, 1H, H-4), 6,03 (da, J=10 Hz, 1H, H-6), 6,27 (dd, J=10 y 2 Hz, 2H, H-2 + H-7), 7,08 (d, J=10 Hz, 1H, H-1).

(C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>). ppm : 0,50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 0,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 1,78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 5,53 (dd, J=10 y 2 Hz, 1H, H-6), 5,89 (dd, J=10 y 3 Hz, 1H, H-7), 6,15 (ba, 1H, H-4), 6,32 (dd, J=10 y 2 Hz, 1H, H-2), 6,50 (d, J=10 Hz, 1H, H-1).

#### VI.2.18. Hidrogenación de pregna-1,4,6-trien-3,20-diona (76).

Una solución de pregna-1,4,6-trien-3,20-diona (76) (25 mg) y cloruro de rodio tris(trifenilfosfina) (Rh(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl) (26 mg) en benceno anhidro/etanol absoluto (5,4 ml de una mezcla 1:1) se hidrogenó a presión atmosférica y temperatura ambiente durante 24 hs. La solución resultante se pasó por una columna de alúmina, obteniéndose como producto una mezcla de dos compuestos principales (analizado por ccd (benceno:etanol 19:1). El análisis espectroscópico por RMN-<sup>1</sup>H indicó la presencia en la mezcla de progesterona (1) y su  $\Delta^6$ -derivado (77) en relación 1:1 (espectro comparado con

los correspondientes a muestras auténticas).

Aumentando el tiempo de hidrogenación (48 hs) se obtuvo como único producto progesterona (1) (20 mg) idéntica espectroscópicamente (RMN-<sup>1</sup>H, tabla III-9, pág. 181) a una muestra auténtica.

#### VI.2.19. Pregna-4,6-dien-3,20-diona (77).

Una solución de progesterona (1) (100 mg) y cloranilo (200 mg) en t-butanol (10 ml) se calentó a reflujo durante 3 hs.

La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (75 ml). Esta solución se llevó a sequedad a presión reducida. El residuo resultante se tomó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con una solución acuosa de KOH (1 %) y luego agua hasta neutralidad. La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida.

El producto obtenido se purificó por ccd preparativa (solvente 4 (8:3)) obteniéndose preña-4,6-dien-3,20-diona (77) (65 mg) como cristales blancos, Pf 146-7°C (Lit.: 133-5°C <sup>7L</sup>; 147-8°C <sup>17C</sup>).

RMN-<sup>1</sup>H. ppm: 0,72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 1,26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 2,15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 5,68 (s, 1H, H-4), 6,13 (s, 2H, H-6 + H-7).

#### VI.2.20. Hidrogenación de preña-4,6-dien-3,20-diona (77).

77 (20 mg) fue hidrogenado en las condiciones descritas en VI.2.18. durante 51 hs. El producto resultante, impurificado con

el catalizador de rodio, se purificó por ccd preparativa (alúmina, hexano:benceno (1:1)). El análisis espectroscópico del producto indicó que se trataba de progesterona (1) (15 mg), como único constituyente.

#### VI.2.21. $11\beta$ -hidroxi-pregna-4,6-dien-3,20-diona (35).

Se oxidó  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2) con cloranilo en las condiciones indicadas en VI.2.19., obteniéndose un producto levemente amarillento, el cual fue purificado por cc (alúmina,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :metanol) y luego por ccd preparativa (solvente 4 (3:1)), aislándose  $11\beta$ -hidroxi-pregna-4,6-dien-3,20-diona (35) (14 mg), Pf  $174-5^\circ\text{C}$  (Lit.  $155-77^\circ\text{C}$ ) <sup>76</sup>.

RMN-<sup>1</sup>H. ppm: 0,96 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -16), 1,39 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 2,15 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -21), 4,44 (m, 1H, H-11 $\alpha$ ), 5,66 (s, 1H, H-4), 6,18 (s, 2H, H-6 + H-7).

#### VI.2.22. $11\beta$ -hidroxi- $5\alpha$ -pregnan-3,20-diona (81)

$11\beta$ -hidroxi-pregna-4,6-dien-3,20-diona (35) (14 mg) fue hidrogenado en las condiciones indicadas en VI.2.18.. Luego de 55 hs se obtuvo un producto cuyo análisis espectroscópico (RMN-<sup>1</sup>H) indicó que se trataba de una mezcla del esteroide de partida (35),  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2) y su 1,2-dihidroderivado (81) en relación (1:2:1).

Repetida la hidrogenación sobre una mezcla (250 mg) de  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2) y sus  $\Delta^1$ ,  $\Delta^6$  y  $\Delta^{1,6}$ -derivados, se obtu

vo, al cabo de 135 hs, como producto prácticamente único 11 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-3,20-diona (81). El mismo se purificó por cc (silica gel H, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetato de etilo) y recristalización de acetato de etilo:hexano (rend: 192 mg), Pf 173-4°C (Lit.: 174-6°C) <sup>171</sup>.

e.m. m/z(intensidad): 314 (53,3; M-H<sub>2</sub>O), 271 (32,6; M-H<sub>2</sub>O-cadena lateral), 244 (8,1; q-H<sub>2</sub>O), 229 (17,8; o-H-H<sub>2</sub>O), 137 (6,2; s-H), 124 (9,8; e), 85 (11,9; r+H), 71 (27,2; r+H), 43 (100; cadena lateral).

(las asignaciones corresponden a las rupturas indicadas en la figura 53, pág. 140).

RMN-<sup>1</sup>H. ppm: 0,89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 1,29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 2,15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 4,40 (m, 1H, H-11 $\alpha$ ).

RMN-<sup>13</sup>C. ppm: 14,13 (C19), 15,86 (C18), 22,58 (C16), 24,33 (C15), 28,32 (C6), 31,16 (C8 + C21), 32,02 (C7), 35,80 (C10), 37,93 (C2)<sup>a</sup>, 38,24 (C1)<sup>a</sup>, 43,09 (C13), 44,09 (C4), 47,76 (C12)<sup>b</sup>, 47,99 (C5)<sup>b</sup>, 57,49 (C9), 57,79 (C14), 63,92 (C17), 68,02 (C11), 208,85 (C20), 211,63 (C3).

a,b: estas asignaciones podrían intercambiarse.

#### VI.2.23. 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84).

Se disolvió progesterona (1) (2 g) en benceno anhidro (75 ml) y se agregó clorhidrato de piridina (2,5 ml de una suspensión en benceno) y etanol absoluto (5 ml). A la solución resultante se agregó bencil mercaptano (2 ml) y se calentó a reflujo.

Luego de 23 hs se dejó enfriar, se diluyó con éter etílico y se lavó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (solución acuosa saturada) y agua hasta

neutralidad. La fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente. El producto obtenido (sólido húmedo de fuerte olor a mercaptanos) se purificó por cc ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y recristalización de acetona, aislándose el 3-benciltiocnoléter 84 (1,14 g),  $\text{mp}$  147-9°C (Lit.: 146,5-8,5°C) <sup>80</sup>, caracterizado por RMN- $^1\text{H}$  (Tabla III-8, pág. 180) y RMN- $^{13}\text{C}$  (Tabla III-11, pág. 202).

VI.2.24. 20-metil-3-metilen-pregna-4,20-dieno (85).

A una solución de bromuro de trifenilmetilfosfonio (1,17 g) en tetrahidrofurano anhidro (30 ml) bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  seco, se agregó butil litio (4,8 ml de solución 0,9 N en hexano). La solución se dejó a temperatura ambiente durante 45', tomando ésta un color rojo intenso.

A dicha solución se agregó progesterona (1) (100 mg) disuelta en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) y se calentó a reflujo. Luego de 24 hs se volcó la solución en una mezcla de agua y éter etílico (75 ml de cada uno). La fase acuosa se extrajo posteriormente con éter etílico y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se juntaron las fases orgánicas, se lavaron con agua, se secaron con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente. El producto se purificó por cc (hexano), obteniéndose 20-metil-3-metilen-pregna-4,20-dieno (85) (84 mg), caracterizado por e.m. (Tabla III-7, pág. 171), RMN- $^1\text{H}$  (Tabla III-10, pág. 182) y RMN- $^{13}\text{C}$  (Tabla III-13, pág. 210).

VI.2.25. 17 $\alpha$ -hidroxi-20-metil-3-metilen-pregna-4,20-dieno (86).

La reacción de Wittig en las condiciones mencionadas en VI.2.24. sobre 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) (300 mg) dio un producto mayoritario (analizado por ccd) el cual fue purificado por cc ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), e identificado como 17 $\alpha$ -hidroxi-3-metilen-pregn-4-en-20-ona (32) (150 mg).

RMN- $^1\text{H}$ . ppm: 0,74 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 1,06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 2,27 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -21), 4,64 (ba, 1H,  $3=\text{CH}_\text{A}$ ), 4,70 (ba, 1H,  $3=\text{CH}_\text{B}$ ), 5,84 (ba, 1H, H-4).

El producto así obtenido fue sometido nuevamente a las condiciones de reacción de Wittig (VI.2.23.), obteniéndose, luego de una purificación por cc (tolueno), una pequeña cantidad de 17 $\alpha$ -hidroxi-20-metil-3-metilen-pregna-4,20-dieno (86) (7 mg), caracterizado por e.m. (Tabla III-7, pág. 171), RMN- $^1\text{H}$  (Tabla III-10, pág. 182) y RMN- $^{13}\text{C}$  (Tabla III-13, pág. 210).

VI.2.26. 20-metil-pregn-20-eno (88).

Pregnan-20-ona (24) (67 mg) fue sometida a las condiciones de reacción de Wittig descritas en VI.2.24., obteniéndose un producto del cual se aisló por cc (hexano) 20-metil-pregn-20-eno (88) (53 mg), caracterizado por e.m. (Tabla III-7, pág. 171), RMN- $^1\text{H}$  (Tabla III-10, pág. 182) y RMN- $^{13}\text{C}$  (Tabla III-13, pág. 210).



VI.2.27. 3-benciltio-17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-3,5-dien-20-ona (91).

En las condiciones mencionadas para la síntesis del 3-benciltioenoléter de progesterona (84) (VI.2.23.) se sintetizó, a partir de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) (1 g), 3-benciltio-17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-3,5-dien-20-ona (91) (550 mg), caracterizada por RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-11, pág. 202).

VI.2.28. 20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (95).

3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) (100 mg) fue transformado en el 20-metilenderivado correspondiente (92) por reacción de Wittig en las condiciones mencionadas en VI.2.24., el cual fue purificado por cc (hexano), obteniéndose 3-benciltio-20-metil-pregna-3,5,20-trieno (95) (92 mg), caracterizado por e.m., RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-10, pág. 182) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-13, pág. 210).

e.m. m/z (intensidad): 418 (11,2; M<sup>+</sup>), 227 (5,4; e-H), 189 (2,8; f-H), 121 (6,0; n-H), 91 (100; tropilio), 81 (10,2; r-H), 69 (9,2; r+H).

(las asignaciones corresponden a las rupturas indicadas en la figura 53, pág. 140).

92 (30 mg) se disolvió en etanol (40 ml) y se agregó HCl concentrado (0,2 ml). La solución se calentó a reflujo. Luego de 1 hora a esa temperatura, se dejó enfriar, se volcó en agua (100 ml) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el solvente.

El producto obtenido se purificó por cc (hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>),

aislándose en forma pura 20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (95) (20 mg), Pf 156-7°C (Lit.: 155-7°C) <sup>172</sup>, caracterizado por e.m. (Tabla III-7, pág. 171), RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-10, pág. 182) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-13, pág. 210).

VI.2.29. 17 $\alpha$ -hidroxi-20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (97).

Se disolvió acetato de plomo (II) trihidrato (7,6 g) en ácido acético glacial (7,5 ml). La solución se calentó a 105°C y se agregó Zn en polvo (2,6 g). Luego de 1' se dejó decantar y se eliminó la solución sobrenadante. El precipitado gris oscuro se lavó por decantación con ácido acético glacial caliente, se enfrió y se lavó por decantación con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (tres veces). La cupla Zn-Pb así obtenida se secó en bomba de vacío durante aproximadamente 1 hora.

A la cupla seca se agregó tetrahidrofurano anhidro (10 ml) y se enfrió a -20°C. Se agregó CH<sub>2</sub>I<sub>2</sub> (1,2 ml) y se dejó 10' a esa temperatura. Luego se fue calentando lentamente la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se dejó 4 hs con agitación. Al cabo de este tiempo se centrifugó la mezcla de reacción en tubos cerrados, obteniéndose una solución del complejo Zn-CH<sub>2</sub>-THF (100).

A una solución de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (3) (150 mg) en tetrahidrofurano (10 ml) se agregó la solución del complejo 100 recién preparada. Se dejó la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Luego de 48 hs se agregó NH<sub>4</sub>Cl (20 ml de solución acuosa al 25 %) y se dejó hasta que no hubo más desprendimiento de gas (CH<sub>4</sub>), se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (solución

acuosa al 10 %) y luego agua, se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente. Al evaporar el solvente apareció un precipitado amarillo insoluble en solventes orgánicos, conjuntamente con el producto deseado, el cual fue purificado por cc ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :acetato de etilo), obteniéndose 17 $\alpha$ -hidroxi-20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (97) (69 mg), Pf 240-1°C (Lit.: 241-3°C) <sup>34</sup>, caracterizado por e.m. (Tabla III-7, pág. 171), RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-10, pág. 182) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-13, pág. 210).

#### VI.2.30. 20-hidroxi-20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (98).

Aplicando el procedimiento anterior (VI.2.29.) sobre 11-desoxicorticosterona (4) (100 mg) se obtuvo el 20-hidroxi-20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (98) (59 mg), Pf 156-7°C (Lit.: 157-8°C) <sup>34</sup>, caracterizado por e.m. (Tabla III-7, pág. 171), RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-10, pág. 182) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-13, pág. 210).

#### VI.2.31. 17 $\alpha$ -hidroxi-20-hidroxi-20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (99).

Partiendo de cortexolona (2) (55 mg) mediante la reacción de sustitución del O-20 por un grupo metileno descrita en VI.2.29. se obtuvo 17 $\alpha$ -hidroxi-20-hidroxi-20-metil-pregna-4,20-dien-3-ona (99) (44 mg), caracterizado por e.m. (Tabla III-7, pág. 171), RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-10, pág. 182) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-13, pág. 210).

VI.2.32. Pregna-3,5-dien-20-ona (102).

Se disolvió pregnenolona (75) (600 mg) en benceno anhidro (50 ml) y se agregó  $P_2O_5$  (1,25 g). La mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora, se dejó enfriar, se diluyó con benceno (50 ml) y se lavó con  $NaHCO_3$  (solución saturada) y luego agua. La fase orgánica se secó con  $MgSO_4$  anhidro y se evaporó el solvente. El producto obtenido se purificó por cc (hexano: $CH_2Cl_2$ ), obteniéndose pregna-3,5-dien-20-ona (102) (190 mg), Pf 141-2°C (Lit.: 139-42°C) <sup>80</sup>, caracterizado por e.m. (Tabla III-1, pág. 141), RMN- $^1H$  (Tabla III-8, pág. 180) y RMN- $^{13}C$  (Tabla III-11, pág. 202).

VI.2.33. Pregna-2,4-dien-20-ona (106).

Se disolvió pregnenolona (75) (750 mg) en  $CH_2Cl_2$ :metanol y se agregó alúmina neutra (4 g). Se evaporó el solvente. La mezcla resultante se calentó a 210-5°C con vacío durante 2 hs, tornándose de color pardo. Al cabo de ese tiempo se dejó enfriar y se expuso en una columna de cromatografía, eluyéndose con  $CH_2Cl_2$ .

El producto crudo se purificó por cc (silicagel H, hexano: $CH_2Cl_2$  (6:4)), obteniéndose una mezcla de pregna-2,4-dien-20-ona (106) y pregna-3,5-dien-20-ona (102) (100 mg, en relación 1:1), los cuales fueron separados por clar preparativa utilizando una columna Altex Ultrasphere ODS y metanol como eluyente, aislándose 106, Pf 117-8°C (Lit.: 116-8°C) <sup>173</sup>, el cual fue caracterizado por e.m. (Tabla III-1, pág. 141), RMN- $^1H$  (Tabla III-8, pág. 180) y RMN- $^{13}C$  (Tabla III-11, pág. 202).

VI.2.34. Pregn-2-en-20-ona (110) y pregn-3-en-20-ona (109).

A una solución de pregnenolona (75) (200 mg) en etanol absoluto (20 ml), se agregó Pd/C (20 mg, 10 %) y se hidrogenó a presión atmosférica y temperatura ambiente.

Luego de 48 hs se filtró el catalizador y se evaporó el solvente. El producto obtenido (200 mg), homogéneo por ccd (solvente 4 (4:1)), fue identificado como 5 $\alpha$ -dihidropregnenolona (118). RMN-<sup>1</sup>H. ppm: 0,62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 0,82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 2,12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 3,60 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ).

El compuesto hidrogenado se disolvió en piridina seca (1 ml) y se agregó cloruro de p-toluensulfonilo (570 mg). Luego de 90 hs a temperatura ambiente se volcó en HCl diluido (44 ml de solución al 10 %) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el solvente. El producto obtenido se purificó por cc (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:metanol) aislándose 3 $\beta$ -tosiloxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (119).

RMN-<sup>1</sup>H. ppm: 0,60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 0,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 2,11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 2,46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-tosiloxi), 4,44 (m, 1H, H-3), 7,34 (d, J=8 Hz, 2H, H-2' + H-6' tosiloxi), 7,81 (d, J=8 Hz, 2H, H-3' + H-5' tosiloxi).

El tosilato se disolvió en colidina (10 ml) y se calentó a reflujo. Luego de 6 hs se volcó la solución en HCl diluido (solución acuosa al 20 %) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el solvente. El producto obtenido se purificó por recristalización de metanol, aislándose una mezcla de pregn-2-en-20-ona (110) y pregn-3-en-20-ona (109), caracterizados por RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-8, pág. 180) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-11, pág. 202).

### VI.3. Estudios sobre la reacción de 3-benciltioenoléteres con níquel Raney.

#### VI.3.1. Reacción de 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) con níquel Raney desactivado.

Una suspensión de W-2 níquel Raney (1,1 g) en acetona (11 ml) se calentó a reflujo durante 1 hora. A la misma se agregó 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) (110 mg) y se continuó el calentamiento durante 4 hs. La mezcla se enfrió, se filtró el metal y se evaporó el solvente. El residuo resultante se separó por clar preparativa en una columna Altex Ultrasphere CDS obteniéndose pregna-3,5-dien-20-ona (102) (61 mg, tiempo de retención (TR): 14,5'), idéntico espectroscópicamente (e.m., RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C) con el producto obtenido como se indica en VI.2.32., pregn-4-en-20-ona (102) (2 mg, TR: 17,0'), Pf 137-8°C, y pregn-3-en-20-ona (109) (7 mg, TR: 18,1'), Pf 126-7°C (Lit.: 128°C) <sup>174</sup>, cuyos espectros de masas, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C se indican en las tablas III-1, pág. 141, III-8, pág. 180, y III-11, pág. 202, respectivamente.

#### VI.3.2. Reacción de 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) con W-2 níquel Raney.

Se disolvió 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) (110 mg) en acetona (11 ml) y se agregó W-2 níquel Raney (1,1 g). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1-4 hs ó se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 hs. Al cabo de ese tiempo se filtró

el metal y se evaporó el solvente, obteniéndose una mezcla de productos (72 mg) la cual fue separada por clar preparativa, utilizando una columna R-Sil C18 HL, en tres fracciones.

La fracción A (5 mg, TR: 9,5') fue analizada por cgl-em, presentando tres picos: pregn-1-en-20-ona (111), pregna-2,4-dien-20-ona (106) y pregna-3,5-dien-20-ona (102) (ver espectros de masa correspondientes en la tabla III-1, pág. 141). La fracción B (53 mg, TR: 10,3') fue separada por clar preparativa en una columna Altex Ultrasphere ODS en pregn-4-en-20-ona (108) (TR: 17,0') y una mezcla (TR: 18,2') de pregn-2-en-20-ona (110) (principal), pregn-3-en-20-ona (109) y pregn-5-en-20-ona (107), identificados por e.m. (Tabla III-1, pág. 141), RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-8, pág. 180) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-11, pág. 202). La fracción C (10 mg, TR: 12,8') fue identificada como 5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (24), Ff 137-8°C (Lit.: 136-7°C)<sup>80</sup>, caracterizado por e.m. (Tabla III-1, pág. 141), RMN-<sup>1</sup>H (Tabla III-8, pág. 180) y RMN-<sup>13</sup>C (Tabla III-11, pág. 202).

### VI.3.3. Reacción de pregna-3,5-dien-20-ona (102) con W-2 níquel Raney.

La reacción de pregna-3,5-dien-20-ona (102) con W-2 níquel Raney en las condiciones detalladas en VI.3.2. (4 hs a temperatura de reflujo), produjo la misma mezcla de eliminación (analizado por clar, cgl-em y RMN-<sup>1</sup>H) que se obtuvo en la eliminación de 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona (84) con W-2 níquel Raney, indicada en VI.3.2.

VI.3.4. Reacción de 3-benciltio-17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-3,5-dien-20-ona (91) con W-2 níquel Raney.

La reacción de 3-benciltio-17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-3,5-dien-20-ona (91) con W-2 níquel Raney en las condiciones descritas en VI.3.2. produjo una mezcla de 17 $\alpha$ -hidroxi-20-cetoesteroides similar a la obtenida con el 17-desoxiesteroide correspondiente. La mezcla solo se analizó por RMN-<sup>13</sup>C identificándose las señales de los carbonos olefínicos de:

- 17 $\alpha$ -hidroxi-pregn-2-en-20-ona (125,62 ppm, C2 + C3) (Principal).
- 17 $\alpha$ -hidroxi-pregn-3-en-20-ona (125,30 ppm, C3; 131,03 ppm, C4).
- 17 $\alpha$ -hidroxi-pregn-4-en-20-ona (119,17 ppm, C4; 144,72 ppm, C5).
- 17 $\alpha$ -hidroxi-pregn-5-en-20-ona (118,50 ppm, C6; 143,38 ppm, C5).
- 17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-3,5-dien-20-ona (122,51 ppm, C6; 124,86 ppm, C4; 128,74 ppm, C3; 141,16 ppm, C5).

No fue posible determinar la presencia en la mezcla de 17 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (89) debido a la complejidad de la región alifática del espectro causada por la superposición de las señales de los carbonos alifáticos de los esteroides mono y diinsaturados mencionados.

VI.3.5. Hidrogenación del producto de reacción de 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona con W-2 níquel Raney.

- i. Hidrogenación total: 60 mg de la mezcla cruda producida en el tratamiento de 3-benciltio-pregna-3,5-dien-20-ona con W-2 níquel Raney en las condiciones indicadas en VI.3.2., se disolvieron en



acetato de etilo (10 ml) y se hidrogenó utilizando Pd/C (6 mg, 10 %) como catalizador, a temperatura ambiente y presión atmosférica durante 3 hs. Se filtró el catalizador y se evaporó la solución.

La mezcla resultante fue separada por clar en una columna Altex Ultrasphere ODS obteniéndose 5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (24) (54 mg, TR: 22,3') y 5 $\beta$ -pregnan-20-ona (114) (6 mg, TR: 19,6'), Pf 114-6°C (Lit.: 116°C) <sup>175</sup> cuyas características espectroscópicas (e.m., RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C) confirmaron las estructuras propuestas.

ii. Hidrogenación parcial: la hidrogenación de 75 mg del mismo producto de eliminación se llevó a cabo en las condiciones detalladas en el punto i. salvo que la reacción se detuvo luego de 1 hora. La mezcla resultante (60 mg) fue separada por clar utilizando una columna Altex Ultrasphere ODS obteniéndose 5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (24) (45 mg, TR: 22,8'), 5 $\beta$ -pregnan-20-ona (114) (2,1 mg, TR: 19,6'), pregn-5-en-20-ona (107) (4,2 mg, TR: 18,2'), Pf 131-2°C (Lit.: 133-5°C) <sup>176</sup> y pregn-4-en-20-ona (108) cuyas características espectroscópicas (e.m., RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C) confirmaron las estructuras propuestas.

VI.3.6. Hidrogenación del producto de reacción de 3-benciltio-17 $\alpha$ -hidroxi-pregna-3,5-dien-20-ona con W-2 níquel Raney.

La mezcla de 17 $\alpha$ -hidroxi-20-ceto-pregnanos (250 mg) resultante de la reacción del benciltioenoléter de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona se hidrogenó (12 hs) en las condiciones indicadas en VI.3.5.1..

El producto obtenido (245 mg) resultó ser una mezcla de

17 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (89) y 17 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (115), los cuales no fueron separados entre sí. Las estructuras propuestas fueron determinadas por RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  (Tabla III-11, pág. 202).

RMN- $^1\text{H}$ . ppm: 0,70 (s, 3H + 3H/10,  $\text{CH}_3$ -18 en 89 y 115), 0,78 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19 en 89), 0,92 (s, 3H/10,  $\text{CH}_3$ -19 en 115), 2,28 (s, 3H + 3H/10,  $\text{CH}_3$ -21 en 89 y 115).

VI.4. Medición de los tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ ) y efecto nuclear Overhauser (enO) de los  $^{13}\text{C}$  de desoxicorticosterona (4) y corticosterona (6).

Desoxicorticosterona (4) (sintetizada según VI.2.2.) y corticosterona (6) (comercial) puras fueron recristalizadas de acetato de etilo bidestilado. Los precipitados fueron recogidos por filtración a través de un papel endurecido y manejados con materiales no metálicos, los cuales podrían impurificar los esteroides con partículas paramagnéticas.

El  $\text{CDCl}_3$  utilizado fue destilado en un equipo de destilación que fuera previamente lavado con detergente (Oakite), con EDTA y finalmente agua desionizada, y secado en estufa ( $105^\circ\text{C}$ ). El solvente fue guardado bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  sin agregado de desecantes, hasta su utilización.

Los  $T_1$  y enO se determinaron a las concentraciones de 40 y 80 mg en 0,4 ml de  $\text{CDCl}_3$ , utilizando tubos para RMN nuevos (5 mm de diámetro).

#### VI.4.1. Medición de $T_1$ .

Para la medición de  $T_1$  se aplicó la secuencia de pulsos esquematizada en la figura 72 (pág. 259).

Los valores de  $D'$  ( $A_t + T'$ ) utilizados corresponden a la técnica de inversión-recuperación rápida, ya que dicho tiempo no es suficiente para lograr la relajación total de los carbonos, trabajandose en condiciones de estado estacionario, para lo cual se

descartaron las cuatro primeras secuencias.

Para restar importancia a pequeños errores en los pulsos se alternó la fase del pulso de  $90^\circ$ , realizándose una vez según  $+x'$  y la siguiente según  $-x'$ , sumándose y restándose la FID obtenida según  $+y'$  en cada caso respectivamente (Figura 72, pág. 259). Experimentalmente, el pulso de  $180^\circ$  correspondió en realidad a  $182^\circ$ , mientras que el de  $90^\circ$  correspondió a  $96^\circ$  (de acuerdo con la conveniencia de un pulso de  $90^\circ$  con error en exceso respecto de los ángulos inferiores a  $90^\circ$ )<sup>137</sup>.

Los valores de  $A_t$  (0,74 s) y  $T'$  (3,6 s) utilizados permiten la determinación adecuada de valores de  $T_1$  de hasta 2,16 s dado que este cumple la relación  $D'/T_1 > 0,5$ .

En cada caso se realizaron 3 espectros (1000 pulsos) con distintos valores de  $T_m$  (Figura 72, pág. 259), correspondiendo el último ( $T_p$ ) a un valor suficientemente grande como para producir la relajación total de los carbonos antes del pulso de  $90^\circ$ .

Para la automatización de la determinación secuencial de los espectros se utilizó la secuencia de incremento indicada en la figura 72 (pág. 259). Esta permite una correcta distribución de los tiempos entre pulsos dentro de un rango determinado. En particular, en los esteroides ensayados se utilizó un valor de  $T_m$  inicial de 0,1 s, de  $I_m$  inicial también de 0,1 s, mientras que el valor de SI elegido fue de 0,05 s. Los valores de  $I_m$  y  $T_m$  resultantes fueron los siguientes:

Espectro	1	2	3	4	5	6	7	8
$I_m$	-	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	-
$T_m$	0,10	0,25	0,45	0,70	1,00	1,35	1,75	5,25

Los primeros cuatro valores de  $T_m$  son los más adecuados para la determinación de los  $T_1$  de los carbonos del anillo estereoidal dado que se encuentran en el rango  $0,3 T_1 < T_m < 1,5 T_1$  (para  $T_1 \approx 0,5$  s), mientras que los espectros 3-7 presentan los valores de  $T_m$  más adecuados para la determinación de los  $T_1$  de los metilos angulares (para  $T_1 \approx 1,5$  s). De este modo se cubrió todo el rango de  $T_m$  necesario para las experiencias realizadas. Finalmente el espectro 8 daría una idea del valor de  $I_\infty$ .

Los espectros fueron representados graficamente con igual escala vertical, determinándose la altura de cada pico. Dichos valores fueron relacionados con los  $T_m$  correspondientes según la ecuación indicada en la pág. 260, obteniéndose a partir de ella los valores de  $T_1$  mediante una regresión no lineal de cuadrados mínimos, la cual no requiere la determinación de  $I_\infty$ , restándole importancia a los errores de  $I_\infty$  en el valor de  $T_1$  que posee en la regresión lineal ( $\log(I_\infty - I_{T_m})$  vs  $T_m$ ).

#### VI.4.2. Medición del incremento por efecto nuclear Overhauser ( $\eta$ ).

Para la medición de  $\eta$  se aplicó la secuencia de pulsos esquematizada en la figura 72 (pág. 259). La misma permite la obtención simultánea de una FID con efecto nuclear Overhauser ( $FID_1$ ) y otra sin el mismo ( $FID_2$ ) (ambas correspondientes a espectros totalmente desacoplados de  $^1H$ ) evitándose así cualquier diferencia debida a la modificación de las condiciones de medición durante la determinación.

Experimentalmente,  $T_a$  correspondió a 2,97 s mientras que

$T_0$  fue de 13 s, lo cual permite la correcta determinación del  $en0$  de aquellos carbonos cuyos  $T_1$  sean menores de 1,5 s, es decir adecuados para las experiencias desarrolladas, salvo en el caso de desoxicorticosterona 40 mg/0,4 ml, donde se emplearon  $T_0 = 10,97$  s y  $T_b = 20$  s debido al mayor  $T_1$  de los metilos angulares correspondientes.

Debido al distinto ensanchamiento de las señales en los espectros con y sin  $en0$  no fue posible determinar  $\eta$  en base a las alturas de las señales. Tampoco fue posible determinarlo en base a la integración de las señales en forma directa ya que no fue posible mantener la integración relativa de un espectro a otro. Por lo tanto se debió proceder de la siguiente manera: Se determinó la integración de cada señal con y sin  $en0$ ; a aquella señal que sufrió el mayor incremento debido al  $en0$  se le asignó un valor de  $\eta = 2$  ( $\eta_{max} = 1,988$ ); en base a esto se calcularon los valores de  $\eta$  para el resto de los carbonos.

## VI.5. Actividad biológica.

### VI.5.1. Generalidades.

Las incubaciones a 37°C fueron realizadas en un baño termostático Vicking modelo Dubnoff, utilizando como medio de cultivo "Minimal Essential Medium" (MEM) ó RPMI-1640 (ambos de Gibco, Grand Island, NY).

Las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga con refrigeración Chilspin (Fisons).

Como trazador radioactivo se utilizó 5-<sup>3</sup>H-uridina (25 Ci/mMol) (New England Nuclear, Boston, USA).

La radioactividad de soluciones acuosas se midió en viales de material plástico (4 ml) utilizando los siguientes sistemas: 1) Tolueno/Triton/ppc/popop; 2) Dioxano/naftaleno/rpo/popop (rpo: 2,5-difeniloxazol; popop: 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benzeno).

Para la determinación de la radioactividad de productos sólidos, estos se disolvieron en 0,2 ml de Protosol (New England Nuclear, Boston, USA), se trasvasaron a viales de plástico y se diluyeron con tolueno, conteniendo ppo y popop.

Las mediciones de radioactividad se realizaron en un contador de centelleo Beckman LS 1000.

i. Animales: se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembras y machos

de 90 días de edad, las cuales fueron adrenalectomizadas bajo anestesia de éter y mantenidas con solución de NaCl (0,9 %) y comida.

Los animales fueron utilizados entre 6 y 8 días luego de ser operados.

ii. Preparación e incubación de timocitos: los animales fueron sacrificados con éter. Se les extrajo el timo, los cuales fueron limpiados de tejidos adyacentes.

Los timos (2 ó 3) fueron colocados en medio de cultivo (MEM ó RPMI-1640) y cortados finamente con tijera. Este proceso produce la liberación de los timocitos, los cuales se encuentran debilmente unidos (no se requiere el uso de detergentes para su separación). La suspensión resultante se filtró por una malla fina para eliminar trozos de tejido. La suspensión de células así obtenida se centrifugó durante 5' a 100 x g.

El precipitado de células se separó de la solución sobrenadante y se resuspendió en medio de cultivo fresco (suspensión madre). Utilizando una alícuota de dicha suspensión se contó el número de células en un hemocitómetro (dilución 1:100).

Las incubaciones se realizaron a 37°C en erlenmeyers siliconados de 50 ml, utilizando 4 ml de suspensión de células en medio de cultivo ( $1,2-1,4 \times 10^7$  células/ml para lo cual se realizaron las diluciones adecuadas de la suspensión madre), bajo atmósfera de  $O_2/CO_2$  (95:5) con suave agitación.

El tiempo de incubación y los aditivos agregados dependen de cada tipo de experimento y son detallados más adelante.

iii. Administración de esteroides: los esteroides se prepararon en soluciones de propilenglicol/etanol (90:10), 100 veces más con



centradas que lo requerido para el ensayo, agregándose 40  $\mu$ l de estas soluciones a cada erlenmeyer (dilución 1:100). A los controles se les agregó 40  $\mu$ l de propilenglicol libre de esteroides.

iv. Terminación de la incubación y procesamiento de las células:

concluida la incubación, las células fueron transferidas a tubos cónicos graduados, se enfriaron en hielo y se separaron inmediatamente del medio de incubación por centrifugación durante 5' a 100 x g. Luego las células se lavaron dos veces con medio de cultivo frío (3 ml). Para ello se resuspendieron las células en medio de cultivo y se reprecipitaron por centrifugación.

Los timocitos se contaron en un hemocitómetro observándose se las células vivas por exclusión de Azul Tripán (dilución 1:10).

Con el conteo de células concluyeron los experimentos de lisis celular. En cambio en el caso de los experimentos de incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina, en todas las variantes descriptas más adelante, los timocitos una vez contados fueron separados del medio de cultivo por centrifugación (10'). Las células se rompieron con agua (1,5 ml), precipitándose el ácido ribonucleico (ARN) con  $\text{HClO}_4$  (0,5 ml de solución al 20 %).

La fracción insoluble se separó por centrifugación (10' a 200 x g), lavándose una vez con  $\text{HClO}_4$  (1 ml de solución al 5 %).

La radioactividad de la fracción insoluble se midió como se indicara anteriormente. Otro tanto se realizó con una alícuota de la solución de  $\text{HClO}_4$  (mezcla de las dos porciones separadas).

La incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a las fracciones soluble e insoluble se expresan en cuentas por minuto/ $10^7$  células vivas.

### VI.5.2. Lisis celular.

Las suspensiones celulares preparadas como se describió anteriormente, se incubaron por triplicado con y sin esteroide durante 16 hs en presencia de 100 U/ml de penicilina.

Al cabo de ese tiempo los timocitos se procesaron como se indicó.

La lisis celular se define como  $100\% - V\%$ , donde  $V\%$  es el porcentaje de células vivas (aquellas que excluyen el Azul Tripán) respecto del control (incubación sin esteroide).

Los esteroides ensayados fueron  $11\beta$ -hidroxiprogesterona (2),  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (3), 11-desoxicorticosterona (4), 21-desoxicortisol (5), corticosterona (6), cortexolona (7), cortisol (8) y sus  $\Delta^1$ -derivados (10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16) a una concentración de  $10^{-4}$  M (ver estructuras correspondientes en la figura 1, pág. 4). En algunos casos se ensayó la lisis a concentraciones de esteroide menores de  $10^{-4}$  M ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M).

Los resultados se encuentran resumidos en la tabla IV-2, (pág. 286).

### VI.5.3. Inhibición de la incorporación de $^3\text{H}$ -uridina a ARN.

i. Incubación normal: en este caso el tiempo de incubación se redujo a 3 hs, no utilizándose penicilina dado el corto período de incubación. 30' antes de concluida ésta, se agregaron 2  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -uridina (en 0,4 ml de medio de cultivo), procesándose como se describió anteriormente.

La incorporación se expresa por  $10^7$  células (tanto en la fracción soluble como en la insoluble en  $\text{HClO}_4$  al 5 %).

La inhibición se expresa como  $100\% - I\%$ , donde  $I\%$  es el porcentaje de cuentas por minuto incorporadas respecto del control (incubación en ausencia de esteroide).

Se ensayaron los mismos esteroides mencionados en el caso anterior (VI.5.2.), aunque a distintas concentraciones que van desde  $10^{-9}$  M hasta  $10^{-4}$  M.

Los resultados se encuentran resumidos en la tabla IV-1 (pág. 275).

ii. Análisis del efecto inhibitorio inmediato: se procedió del mismo modo que en la incubación normal salvo que el tiempo total de incubación se redujo a 45'. La  $^3\text{H}$ -uridina se agregó 15' antes de concluir la incubación.

En este caso los esteroides ensayados fueron corticosterona (6) y  $\Delta^1-11\beta$ -hidroxiprogesterona (10) a una concentración de  $10^{-4}$  M.

Los resultados se encuentran resumidos en la figura 78 (pág. 299).

#### VI.5.4. Efecto del lavado sobre la acción glucocorticoide.

i. Lavado simple: la suspensión de células se incubó a  $37^\circ\text{C}$  en presencia o ausencia de esteroide (por triplicado) durante un determinado tiempo  $T_1$  (ver esquema de estas experiencias en la tabla IV-3, pág. 301), al cabo del cual se pasó a tubos cónicos y se centri

fugó a temperatura ambiente (5' a 100 x g).

Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con 10 ml de medio de cultivo libre de esteroides a temperatura ambiente (por resuspensión y centrifugación).

Los timocitos lavados de esteroide se suspendieron en 1 ml de medio de cultivo y se trasvasaron a erlenmeyers siliconados. Los tubos cónicos se lavaron con medio de cultivo (3 x 1 ml) el cual se juntó con la suspensión de células en los erlenmeyer correspondientes.

Las suspensiones de células resultantes, libres de esteroides, se reincubaron durante un período de tiempo  $T_2$ , 30' antes de culminado el cual se les suministró  $^3\text{H}$ -uridina ( $2\text{ }\mu\text{Ci}$  en 0,4 ml de medio de cultivo), procesándose como se detalló anteriormente en forma general.

Utilizando  $T_1=40'$  y  $T_2=140'$  se ensayaron los esteroides corticosterona (5) ( $10^{-4}\text{ M}$ ) y  $\Delta^1-11\beta$ -hidroxiprogesterona (10) ( $10^{-5}\text{ M}$ ). Además se realizaron ensayos con este último esteroide pero a una concentración  $10^{-4}\text{ M}$  a los siguientes  $T_1$  y  $T_2$ :

$T_1$	40'	40'	120'	120'
$T_2$	60'	140'	60'	140'

Los resultados se resumen en la tabla IV-3 (pág. 301).

ii. Naturaleza de la fracción insoluble en  $\text{HClC}_4$  en la incubación con lavado: se realizó una experiencia de lavado ( $T_1=120'$ ;  $T_2=60'$ ) en igual modo que se indicara en el punto anterior hasta el

aislamiento de la fracción insoluble en  $\text{HClO}_4$  al 5 %. Una porción de la misma (10 %) se incubó con ARNasa ( $20 \mu\text{g}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  durante 30', al cabo de la cual se volvió a fraccionar el producto por precipitación con  $\text{HClO}_4$ . Para favorecer la precipitación de la fracción insoluble se agregó albúmina, la cual contribuye a aumentar el tamaño del precipitado.

Este ensayo solo se realizó con  $\Delta^1-11\beta$ -hidroxiprogesterona (10) ( $10^{-4}$  M), observándose la solubilización total de la radioactividad.

iii. Lavado y respuesta posterior a esteroides: la suspensión de células se incubó a  $37^\circ\text{C}$  en presencia o ausencia de  $\Delta^1-11\beta$ -hidroxiprogesterona (10) (por sextuplicado) a una concentración de  $10^{-4}$  M durante 40'. Al cabo de ese tiempo las células se lavaron con esteroides como se indicó en el punto i.. Las células se reincubaron en medio libre de esteroide durante 120'.

Entonces cada sextuplicado se dividió en dos grupos, a uno de los cuales se agregó propilenglicol ( $40 \mu\text{l}$ ) y al otro una solución de esteroide (el esteroide anterior 10 ó corticosterona (6)) en propilenglicol ( $40 \mu\text{l}$  de solución  $10^{-2}$  M).

La incubación se continuó durante 90' más, 15' antes de completarse los cuales se agregó  $^3\text{H}$ -uridina, procesándose finalmente como de costumbre.

Los resultados se resumen en la tabla IV-4 (pág. 305).

## VI.5.5. Efecto de la actinomicina D sobre la acción glucocorticoide.

En este caso las incubaciones se realizaron en tubos de ensayos siliconados, trabajándose con 1 ml de suspensión de células ( $1,4 \times 10^7$  células). Se realizó la incubación de la misma a  $37^\circ\text{C}$  en presencia o ausencia de actinomicina D ( $0,3 \mu\text{g/ml}$ ) (por sextuplicado) durante 30'.

Al cabo de ese tiempo los sextuplicados se dividieron en dos grupos, a uno de los cuales se le agregó propilenglicol ( $10 \mu\text{l}$ ) y al otro una solución de esteroide en propilenglicol ( $10 \mu\text{l}$ ). La incubación se continuó durante un tiempo  $T_1$ , 15' antes de concluir la cual se agregó  $^3\text{H}$ -uridina, procesándose como de costumbre.

Los esteroides ensayados fueron  $\Delta^1-11\beta$ -hidroxiprogesterona (10) ( $T_1=45'$ ) a una concentración final de  $10^{-4}$  M, y corticosterona (6) ( $T_1=20'$ ) a una concentración final de  $10^{-6}$  M.

RESUMEN

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo interdisciplinario ha sido la búsqueda de las características que dan a un esteroide propiedades glucocorticoides, mediante la utilización de la resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  para la determinación de las diferencias conformacionales en solución de los compuestos analizados. Para ello se trabajó con derivados de progesterona (pregn-4-en-3,20-diona) hidroxilados en posiciones  $11\beta$ ,  $17\alpha$  y/o 21, y sus  $\Delta^1$ -derivados.

En esta tesis se desarrollaron los siguientes temas:

1. Introducción a la actividad glucocorticoide, donde se describe en forma breve los efectos generales de los glucocorticoides en el organismo, detallándose en particular su acción sobre el timo, órgano blanco elegido en la presente tesis. Finalmente se describen los principales trabajos sobre correlación estructura-actividad presentes en literatura, discutiéndose ventajas, inconvenientes y alcance de cada uno de ellos.

2. Presentación y discusión de los resultados obtenidos en cuanto a la síntesis de esteroides, necesarios para la determinación de las características estructurales y de actividad biológica de los mismos, o como compuestos modelo que contribuyeron a la interpretación de los resultados espectroscópicos. Se describen:

i. Síntesis de pregn-4-en-3,20-dionas: en este caso se sintetizaron cuatro esteroides, dos de ellos (11-desoxicorticosterona y cortexolona) por una secuencia de 21-hidroxilación, mientras que la



síntesis de los otros dos ( $11\beta$ -hidroxiprogesterona y 21-desoxicortisol) consistió en la eliminación de un hidroxilo 21 de las estructuras de partida.

ii. Síntesis de pregna-1,4-dien-3,20-dionas: en este caso se sintetizaron ocho esteroides (pregna-1,4-dien-3,20-diona y sus derivados hidroxilados en posiciones  $11\beta$ ,  $17\alpha$  y/o 21), principalmente por reacción de oxidación de las pregn-4-en-3,20-dionas correspondientes (como tales o protegidos sus hidroxilos) con 2,3-diciano-5,6-dicloro-benzoquinona (DDQ) en benceno anhidro. En este punto se discute también la obtención de  $\Delta^1$ -21-desoxicortisol y  $\Delta^1$ -cortisolona por oxidación con DDQ utilizando distintos grupos protectores de los hidroxilos correspondientes.

iii. Síntesis de esteroides marcados: se sintetizaron esteroides marcados con deuterio (2,2,4,6,6,17,21,21,21- $d_9$ -progesterona; 2,2,4,6,6- $d_5$ -cortisol; 4,6,6,17,21,21,21- $d_7$ - $\Delta^1$ -progesterona y 4,6,6,21,21,21- $d_6$ - $\Delta^1$ -17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona), de suma utilidad para la asignación de las señales de los espectros de masas y RMN- $^{13}C$  de los compuestos analizados. Se desarrolló también una secuencia de reacciones que permitirían la obtención de  $\Delta^1$ -progesterona y  $\Delta^1$ - $11\beta$ -hidroxiprogesterona fuertemente tritadas, de suma utilidad en estudios biológicos (distribución "in vivo", metabolización, acumulación, etc.).

iv. Síntesis de 20-metilenesteroides: se prepararon análogos de los esteroides en estudio a los cuales se les reemplazó el oxígeno de posición 20 por un grupo  $CH_2$ , mediante la clásica reacción de Wittig (3,20-dimetilen-pregn-4-eno, 17 $\alpha$ -hidroxi-3,20-dimetilen-pregn-4-eno, 20-metilen-pregnano, 3-benciltio-20-metilen-pregna-3,

5-dieno y 20-metilen-pregn-4-en-3-ona), o utilizando la reacción de  $\alpha$ -hidroxicetonas con complejos  $Zn-CH_2$  (17 $\alpha$  y/o 21 hidroxiderivados de 20-metilen-pregn-4-en-3-ona). Estos compuestos fueron de suma utilidad en estudios espectroscópicos ensayados.

v. Reacción de eliminación de benciltioenoléteres con níquel Raney:

se estudió en detalle esta reacción utilizando níquel Raney de distinta actividad, identificándose los productos obtenidos en cada caso y proponiéndose un mecanismo para la formación de los mismos.

Los compuestos sintetizados fueron caracterizados por espectrometría de masas, RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$ .

3. Discusión de las características espectroscópicas de los esteroides sintetizados, en este punto el análisis de las propiedades espectroscópicas de las distintas series de esteroides disponibles tuvo dos finalidades distintas:

i. Análisis comparativo de los espectros de masas, RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$

de las mismas: los espectros de masas se analizó la influencia de los distintos grupos funcionales presentes sobre las fragmentaciones, actuando solos o modulándose entre si. En particular resultó sumamente interesante el efecto del hidroxilo 17 $\alpha$  sobre la principal fragmentación de los  $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroides (picos m/z 121-122) el cual fue analizado en detalle, empleando esteroides marcados con deuterio, postulándose un posible mecanismo para dicha influencia "a larga distancia".

En los espectros RMN- $^1H$  se analizó nuevamente el efecto de las distintas funcionalidades en el  $\delta$  de las principales señales presentes. Se verificó la utilidad de las tablas desarrolladas por Zürcher

para el cálculo del  $\delta$  de metilos angulares, y la buena predicción lograda con tablas para el cálculo del  $\delta$  de hidrógenos olefínicos, salvo en el caso de esteroides sumamente tensionados ( $\Delta^{2,4}$ -esteroides), donde los valores calculados discreparon notablemente de los realmente observados.

Finalmente en los espectros RMN- $^{13}\text{C}$  se discute su asignación utilizando distintas secuencias de pulsos y marcación con deuterio, la adecuada predicción de espectros lograda mediante la utilización del método semiempírico desarrollado por Beierbeck y colaboradores, y el estudio del efecto de sustituyentes en el  $\delta$  de los carbonos esteroidales, en particular respecto de la necesidad o no de una igualdad del esqueleto base calculado y de los modelos en los que se determinó el efecto de sustituyente, llegándose a la conclusión que solo es indispensable una igualdad zonal entre dichos esqueletos (igualdad en la región del esteroide donde se encuentra el sustituyente en cuestión).

ii. Análisis conformacional por RMN- $^{13}\text{C}$  de pregn-4-en-3,20-dionas y sus  $\Delta^1$ -derivados: en la determinación de las modificaciones conformacionales en solución de estos esteroides, necesaria para su posterior comparación con los resultados obtenidos en cuanto a la actividad glucocorticoide de los mismos, se emplearon tres procedimientos distintos:

El primero consistió en el análisis del efecto de la hidroxilación en posiciones  $11\beta$ ,  $17\alpha$  y  $21$ , y de la introducción de un doble enlace  $1,2$  sobre el  $\delta$  de los carbonos del esqueleto esteroideal que teóricamente no deberían afectarse. Se determinó así que la introducción de un doble enlace  $1,2$  produce la curvatura de los anillos

A y D del esteroide hacia la cara  $\alpha$  del mismo, así como la torsión de los anillos B y C; la 11 $\beta$ -hidroxilación produjo también la curvatura del esteroide hacia la cara  $\alpha$ , mientras que la 17 $\alpha$ -hidroxilación no afectó la conformación del anillo A del esqueleto base, a diferencia de lo que sucede en el estado cristalino; finalmente la 21-hidroxilación no afectó la conformación del núcleo esteroide.

El segundo método consistió en el análisis del corrimiento de algunas señales en los espectros RMN- $^{13}\text{C}$  por agregado de  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Mediante el mismo se determinó la proporción de puentes de hidrógeno que se produce entre el carbonilo-20 y los hidroxilos 17 $\alpha$  y 21 en los mono y el dihidroxiesteroides correspondientes.

Por último se ensayó con 11-desoxicorticosterona y corticosterona la utilidad del método de Woessner (determinación de las barreras rotacionales de los metilos 18 y 19 por medición de sus tiempos de relajación y efecto nuclear Overhauser) para el análisis conformacional de esteroides en solución. Se determinó así la distorsión de la región de los anillos C y D del esteroide debida a la 11 $\beta$ -hidroxilación.

4. Determinación de la actividad glucocorticoide de pregn-4-en-3,20-diones y sus  $\Delta^1$ -derivados, como parámetros glucocorticoides se determinaron:

1. Inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN: se determi

nó este parámetro a lo largo de un amplio rango de concentración ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M), analizándose la sensibilidad de los esteroides, su valor de inhibición cuando se produce la saturación de la respuesta (valor "plateau"), y el efecto a la mayor concentración ensayada ( $10^{-4}$  M). Resultó interesante la presencia de compuestos que se

apartaron del comportamiento clásico de los glucocorticoides, produciendo curvas dosis-respuesta de no saturación. El caso más destacado fue el de  $11\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona, el cual se comportó como un glucocorticoide muy débil hasta una concentración de  $10^{-5}$  M, produciéndose luego un aumento notable en su actividad a mayores concentraciones, llegando a niveles de inhibición superiores a los producidos por glucocorticoides clásicos a  $10^{-4}$  M.

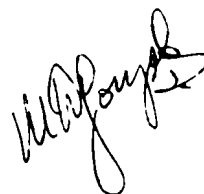
ii. Lisis celular: se analizó este parámetro a una concentración de  $10^{-4}$  M observándose algunas discrepancias con lo predicho por el mecanismo clásico de acción que considera la inhibición de la síntesis de ARN como causante de la lisis final de la célula. En varias circunstancias se observó la disociación de los dos eventos, siendo el caso más interesante el de  $11\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona el cual no produjo lisis pese a su potente acción inhibitoria a esa concentración. El comportamiento de este esteroide se analizó a menores concentraciones observándose nuevamente diferencias entre su comportamiento a bajas concentraciones respecto de lo que sucede a la mayor concentración analizada.

Finalmente se analizó también el mecanismo por el cual  $11\beta$ -hidroxi-pregna-1,4-dien-3,20-diona ejerce su acción a  $10^{-4}$  M encontrándose que este cumple los tres requisitos (acción inmediata, no perdurabilidad del efecto luego de la eliminación del esteroide, insensible a la acción de inhibidores de la síntesis de ARN) para considerar que esta se produce por un mecanismo no genómico (al menos la acción sobre la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a ARN que fue el efecto analizado).

5. Correlación estructura-actividad, en este punto se intenta correlacionar las características funcionales-conformacionales de los esteroides analizados con sus propiedades biológicas. Se determinó que el hidroxilo  $11\beta$  actuaría como tal y no a través de una alteración conformacional del esteroide. Posiblemente la acción del hidroxilo  $21$  también sea de este tipo, aunque no es posible descartar una acción moduladora del mismo sobre el carbonilo  $20$ . Se descartó la posibilidad de una curvatura óptima del esteroide como único determinante de la actividad.

La acción del doble enlace  $1,2$  y del hidroxilo  $17\alpha$ , también analizados, resultó ambigua y no fue posible su interpretación en base a los datos disponibles.

6. Parte experimental de la labor realizada, donde se detallan las síntesis realizadas, las técnicas espectroscópicas especiales empleadas y los distintos ensayos de actividad glucocorticoide desarrollados.



Parte de este trabajo dio lugar a las siguientes publicaciones:

- "Dissociation of Glucocorticoid Effects of C-21 Steroids at High Concentrations in Thymocytes".  
M. B. Castillo, M. D. Gonzalez, G. Burton, C. P. Lantos  
y A. Roldán.  
Experientia, 39, 617 (1983).
- "A Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance Study of the 1,4-Diene Analogs of Steroid Hormones and Related Steroids".  
M. D. Gonzalez y G. Burton.  
Organic Magnetic Resonance, 22, 586 (1984).
- "On the Elimination of the 3-Benzylthioenol Ether of Pregn-4-ene-3,20-dione by W-2 Raney Nickel".  
M. D. Gonzalez y G. Burton.  
Z. Naturforschung, en prensa.
- "Electron Impact Induced Fragmentations of the 1,4-Diene Analogs of Steroid Hormones and Related Steroids".  
M. D. Gonzalez y G. Burton.  
Biomedical Mass Spectrometry, en prensa.

## BIBLIOGRAFIA



- 1) H. A. Harrer, "Manual de Química Fisiológica", Ed. El Manual Moderno, S.A., Mexico (1980), a) pág. 584.  
b) pág. 589.
- 2) C. P. Lantos, en "Endocrinología Molecular" (coordinadores R. S. Calandra y A. F. De Nicola), Librería "El Ateneo" editorial, Buenos Aires (1980), pág. 173.
- 3) A. F. De Nicola, en referencia 2, pág. 157.
- 4) J. D. Baxter y G. G. Rousseau, "Monographs on Endocrinology". Vol. 12: Glucocorticoid Hormone Action, Springer-Verlag, Berlin (1979), pág. 1.
- 5) F. Homo, D. Duval, J. Hatzfeld y C. Evrard, J. Steroid Biochem., 13, 135 (1980).
- 6) J. F. A. P. Miller, Thymus, 1, 3 (1979).
- 7) A. Munck y K. Leung, en "Modern Pharmacology-Toxicology". Vol. 8: Receptors and mechanism of action of steroid hormones (editado por J. E. Pasqualini), Marcel Dekker, Inc., New York (1977), pág. 314, y referencias allí citadas.
- 8) A. Roldán, G. Burton, M. E. Castillo, M. C. Damasco y C. P. Lantos, J. Steroid Biochem., 15, 467 (1981), y referencias allí citadas.
- 9) M. Rubin Sherman, en referencia 4, pág. 123.
- 10) C. Hansch y J. Fujita, J. Am. Chem. Soc., 86, 1616 (1964).
- 11) S. M. Free y J. W. Wilson, J. Med. Chem., 7, 395 (1964).
- 12) W. L. Duax, J. F. Griffin, D. C. Rohrer y C. M. Weeks, Lipids, 15, 783 (1980).
- 13) C. M. Weeks, W. L. Duax y N. E. Wolff, J. Am. Chem. Soc., 95, 2865 (1973).

- 14) J. P. Schmit y G. G. Rousseau, *J. Steroid Biochem.*, 2, 921 (1978).
- 15) G. G. Rousseau y J. P. Schmit, *J. Steroid Biochem.*, 8, 911 (1977).
- 16) J. P. Schmit y G. G. Rousseau, *J. Steroid Biochem.*, 8, 921 (1977).
- 17) J. P. Schmit y G. G. Rousseau, *J. Steroid Biochem.*, 9, 909 (1978).
- 18) J. P. Schmit y G. G. Rousseau, en referencia 4, pág. 79.
- 19) M. E. Wolff, J. Baxter, P. A. Kollman, D. L. Lee, I. D. Kuntz, E. Bloom, D. Matulich y J. Morris, *Biochemistry*, 17, 3201 (1978).
- 20) M. E. Wolff, en referencia 4, pág. 97.
- 21) M. E. Wolff, W. Ho y M. Honjoh, *J. Med. Chem.*, 9, 682 (1966).
- 22) J. P. Raynaud, J. Ojasoo, M. M. Ecuton y D. Philibert, en "Drug Design". Vol. 8 (editado por E. J. Ariens), Academic Press, New York (1978), pág. 170.
- 23) J. Delettre, J. P. Mornon, G. Lepicard, T. Ojasoo y J. P. Raynaud, *J. Steroid Biochem.*, 13, 45 (1979).
- 24) D. D. Giannini, P. A. Kollman, N. S. Bhacca y M. E. Wolff, *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 5462 (1974).
- 25) P. A. Kollman, D. D. Giannini, W. L. Duax, S. Rothenberg y M. E. Wolff, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 2869 (1973).
- 26) D. H. Grant y B. V. Cheney, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 5315 (1963).
- 27) P. Genard, *J. Steroid Biochem.*, 2, 497 (1976).
- 28) H. Beyerbeck, J. K. Saunders y J. W. ApSimon, *Can. J. Chem.*, 55, 2813 (1977).
- 29) Sigma Chemical Company, catálogo de productos, Febrero 1984.

- 30) N. Bodor, L. Fey, M. Kircz y F. Hodosan, *Revue Roumaine de Chimie*, 9, 147 (1964).
- 31) E. S. Rothman, T. Perlstein y M. E. Wall, *J. Org. Chem.*, 25, 1966 (1960).
- 32) H. J. Ringold y G. Stork, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 250 (1958).
- 33) G. S. Stork, H. J. Ringold, F. Sondheimer y G. Rosenkranz (to Syntex), U.S. 2,874,154. Feb. 17, 1959 (Chem. Abstr. 53:16221c). Syntex S.A., Brit. 766,858. June 12, 1957 (Chem. Abstr. 52:466a). Societa Farmaceutici Italia, Soc. Anon. (by B. Camerino, B. Patelli y D. Cattapan), Ger. 1,100,628 (Cl. 12o). Appl. Mar. 16, 1959, Brit. Mar. 21, 1958 (Chem. Abstr. 56:4827f).
- 34) L. H. Sarett (to Merck & Co., Inc.), U.S. 2,912,446. Nov. 10, 1959 (Chem. Abstr. 54:3527a). Merck & Co., Inc. (by L. H. Sarett), Ger. 1,018,418. Oct. 31, 1957 (Cl. 12o) (Chem. Abstr. 52:623b).
- 35) Boots Pure Drug Co. Ltd., Fr. 1,513,708 (Cl. C 07c), (A 61k), Feb. 16, 1968, Brit. Appl. Feb. 19, 1966- Dec. 15, 1966 (Chem. Abstr. 71:13234m).
- 36) M. Numazawa y M. Nagaoka, *J. Org. Chem.*, 50, 81 (1985).
- 37) H. L. Herzog, M. J. Gentles, H. Marshall y E. B. Hershberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 4073 (1961).
- 38) M. Shirasaka, M. Tsuruta, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 9, 207 (1961) (Chem. Abstr. 56:10694g).
- 39) D. Walker y J. D. Hiebert, *Chem. Rev.*, 67, 153 (1967).
- 40) D. Eurn, V. Petrow y G. C. Weston, *Tetrahedron Letters*, 14 (1960).

- 41) G. Muller, J. Martel y C. Huynh, Bull. Soc. Chim. France, 2000 (1961).
- 42) T. Kubota, K. Yoshida, F. Hayashi y K. Takeda, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 13, 50 (1965) (Chem. Abstr. 62:13203e).
- 43) British Drug Houses Ltd. (by G. O. Weston, D. Burn, D. N. Kirk y V. Petrow), Brit. 354,343. Nov. 16, 1960 (Chem. Abstr. 55:18313h).
- 44) J. N. Gardner, F. E. Carlon y O. Gnoj, J. Org. Chem., 33, 3294 (1968).
- 45) T. H. Stoudt, W. J. McAleer, J. M. Chemerda, M. A. Kozlowski, R. F. Hirschmann, V. Marlatt y R. Miller, Arch. Biochem. and Biophys, 59, 304 (1955) (Chem. Abstr. 50:3558f).
- 46) D. H. R. Barton, N. K. Basu, R. H. Hesse, F. S. Morchouse y M. M. Pechet, J. Am. Chem. Soc., 88, 3016 (1966).
- 47) Organon Laboratories Ltd., Brit. 811,867. Apr. 15, 1959 (Chem. Abstr. 53:22098e).
- 48) S. A. Szpilfogel, T. A. P. Posthumus, M. S. de Winter y D. A. van Dorp, Rec. Trav. Chim., 75, 475 (1956) (Chem. Abstr. 51:1239b).
- 49) E. Merck Akt.-Ges. (by H. J. Mannhardt y K. Brückner), Ger. 1,060,393. July 2, 1959 (Cl. 12o). (Chem. Abstr. 55:8482i).
- 50) D. R. Idler y E. Truscott, Steroids, 2, 457 (1967).
- 51) Olin Mathieson Chemical Corp., Brit. 796,386. June 11, 1958 (Chem. Abstr. 53:1420f).
- 52) Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd., Brit. 844,319. Aug. 10, 1960 (Chem. Abstr. 55:10510e).  
Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd. (by M. Nishikawa y K.

- Morita), Japan 9,624 ('60), July 21 (Chem. Abstr. 55:10512e).
- 53) Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd. (by H. Ishikawa y H. Morita), Japan 10,866 ('60), Aug. 10 (Chem. Abstr. 55:11480i). Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd. (by H. Ishikawa y K. Morita), Japan 17,312 ('60), Nov. 25 (Chem. Abstr. 55:17696a).
- 54) H. J. Ringold y A. Turner, Chem. Ind. (London), 211 (1962).
- 55) E. P. Oliveto, C. Gerold, L. Weber, H. E. Jorgensen, R. Rausser y E. B. Hershberg, J. Am. Chem. Soc., 75, 5486 (1953).
- 56) E. P. Oliveto, C. Gerold, R. Rausser y E. B. Hershberg, J. Am. Chem. Soc., 77, 3564 (1955).
- 57) E. J. Corey, J. L. Gras y P. Ulrich, Tetrahedron Letters, 309 (1976).
- 58) R. T. Blickenstaff, J. Am. Chem. Soc., 82, 3673 (1960).
- 59) R. E. Beyler, F. Hoffman, R. M. Moriarty y L. H. Sarett, J. Org. Chem., 26, 2421 (1961).
- 60) J. H. Fried, G. E. Arth y L. H. Sarett, J. Am. Chem. Soc., 81, 1235 (1959).
- 61) R. N. Icke, C. E. Redemann, B. E. Wisegarver y G. A. Alles, Org. Synth., Coll. Vol. III, 644 (1955).
- 62) R. Gardi, R. Vitali y A. Ercoli, J. Org. Chem., 27, 668 (1962).
- 63) S. Profeta, Jr, P. A. Kollman y M. E. Wolff, J. Am. Chem. Soc., 104, 3745 (1982).
- 64) V. R. Mattox, J. Am. Chem. Soc., 74, 4340 (1952).
- 65) G. Greenspan, C. P. Schaffner, W. Charney, H. L. Herzog y E. B. Hershberg, J. Am. Chem. Soc., 79, 3922 (1957).
- 66) F. J. Brown y C. Djerassi, J. Am. Chem. Soc., 102, 307 (1980).

- 67) N. S. Bhacca, D. D. Giannini, W. S. Jankowski y M. E. Wolff, J. Am. Chem. Soc., 95, 8421 (1973).
- 68) S. K. Malhotra y H. J. Ringold, J. Am. Chem. Soc., 86, 1997 (1964).
- 69) J. Fried y J. A. Edwards, "Organic Reactions in Steroid Chemistry". Vol. II, Van Nostrand Reinhold Company, New York (1972), pág. 148.
- 70) A. E. Torner, J. Chem. Soc., 2568 (1968).
- 71) C. Djerassi y J. Gutzwiller, J. Am. Chem. Soc., 88, 4537 (1966).
- 72) D. A. Shepherd, R. A. Donia, J. A. Campbell, B. A. Johnson, R. P. Holysz, G. Lomp, Jr., J. E. Stafford, R. L. Pederson y A. C. Ott, J. Am. Chem. Soc., 77, 1212 (1955).
- 73) H. J. Brodie, K. Raab, G. Possanza, N. Seto y M. Gut, J. Org. Chem., 34, 2697 (1969).
- 74) E. I. Agnello y G. D. Laubach, J. Am. Chem. Soc., 82, 4293 (1960).
- 75) E. I. Agnello y G. D. Laubach, J. Am. Chem. Soc., 79, 1257 (1957).
- 76) M. Mousseron-Lanet y B. Labeeuw, Bull. Soc. Chim. France, 4171 (1968).
- 77) R. E. Harmon, S. V. Gupta y D. J. Brown, Chem. Rev., 73, 21 (1973).
- 78) A. Maercker, Org. Reactions, 14, 270 (1965).
- 79) F. Sondheimer y R. Mechoulam, J. Am. Chem. Soc., 79, 5029 (1957).
- 80) J. Komo, M. Romero, C. Djerassi y G. Rosenkranz, J. Am. Chem. Soc., 73, 1528 (1951).

- 81) W. L. Duax y D. A. Norton, "Atlas of Steroid Structures", IFI/PLENUM Data Company, New York (1975).
- 82) H. E. Simmons, T. L. Lairns, S. A. Vladuchick y C. M. Hoiness, *Org. Reactions*, 20, 1 (1973).
- 83) I. T. Harrison, R. J. Rawson, R. Turnbull y J. E. Fried, *J. Org. Chem.*, 36, 3515 (1971).
- 84) L. N. Nysted (Searle, G. D. and Co), Ger., Offen. 1,803,276 (Cl. C 07cf). Jun. 4, 1969. U.S. Appl. Oct. 17, 1967 (Chem. Abstr. 71:61686r).
- 85) E. LeGoff, *J. Org. Chem.*, 29, 2048 (1964).
- 86) G. Rosenkranz, St. Kaufmann y J. Romo, *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 3689 (1949).
- 87) J. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2231 (1950).
- 88) R. Mozingo, en referencia 61, pág. 131.
- 89) R. F. Zürcher, *Helv. Chim. Acta*, 46, 2054 (1963).
- 90) C. C. Beard, en referencia 69, pág. 344.
- 91) H. Eggert y C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, 46, 5399 (1981).
- 92) G. R. Pettit y E. E. van Tamelen, *Org. Reactions*, 12, 373 (1962).
- 93) H. Hauptmann y W. F. Walter, *Chem. Rev.*, 62, 347 (1962).
- 94) J. E. Bridgeman, P. C. Cherry, A. S. Clegg, J. M. Evans, Sir E. R. H. Jones, A. Kasal, V. Kumar, G. D. Meakins, Y. Morisawa, E. E. Richards y P. D. Woodgate, *J. Chem. Soc.*, 250 (1970).
- 95) L. Tökés, R. T. LaLonde y C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, 32, 1020 (1967).
- 96) R. L. Augustine, en referencia 69, a) pág. 119.  
b) pág. 123.

- 97) C. W. Shoppee, B. D. Agashe y G. R. H. Summers, J. Chem. Soc., 3107 (1957).
- 98) H. Alper y J. T. Edward, J. Organomet. Chem., 14, 411 (1968).
- 99) R. L. Augustine y E. Reardon, Org. Prep. Proc., 1, 107 (1969).
- 100) M. L. H. Green, en "Organometallic Compounds". Vol. II: The Transition Elements (editado por G. E. Coates, M. L. H. Green y K. Wade), Methuen & Co. Ltd., London (1968), pág. 40.
- 101) M. F. Semmelhack, Org. Reactions, 19, 128 (1972).
- 102) M. L. H. Green, en referencia 100, pág. 317.
- 103) L. F. Fieser y M. Fieser, "Steroids", Reinhold Publishing Corporation, New York (1959), pág. 278.
- 104) R. K. Haynes, W. R. Jackson y A. Stragalinous, Aust. J. Chem., 33, 1537 (1980).
- 105) J. W. Blunt y C. E. Stothers, Org. Magnetic Resonance, 2, 439 (1977).
- 106) H. Beierbeck y J. K. Saunders, Can. J. Chem., 53, 1307 (1975).
- 107) H. Beierbeck y J. K. Saunders, Can. J. Chem., 54, 632 (1976).
- 108) H. Beierbeck y J. K. Saunders, Can. J. Chem., 54, 2985 (1976).
- 109) D. E. Woessner, J. Chem. Phys., 37, 647 (1962).
- 110) J. W. ApSimon, H. Beierbeck y J. K. Saunders, Can. J. Chem., 53, 338 (1975).
- 111) H. Budzikiewicz y C. Djerassi, J. Am. Chem. Soc., 84, 1430 (1962).
- 112) G. von Unruh y G. Spiteller, Tetrahedron, 26, 3289 (1970).
- 113) M. F. Grostic y K. L. Rinehart, Jr., J. Org. Chem., 33, 1740 (1968).
- 114) Z. V. Zaretskii, "Mass Spectrometry of Steroids", John Wiley



- & Sons, New York (1976), pág. 106.
- 115) U. Eppenberger, W. Vetter y T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta*, 49, 1505 (1966).
- 116) R. I. Reed, *J. Chem. Soc.*, 3432 (1958).
- 117) G. Spiteller, M. Spiteller, M. Ende y G. A. Hoyer, *Org. Mass Spectrom.*, 13, 646 (1978).
- 118) P. Toft y B. A. Lodge, *Can. Spectrosc.*, 15, 137 (1970).
- 119) E. Bailey, *Steroids*, 10, 527 (1967).
- 120) H. Budzikiewicz, C. Djerassi y D. H. Williams, "Mass Spectrometry of Organic Compounds", Holden-Day, Inc., San Francisco (1967), pág. 115.
- 121) C. Djerassi, J. Karliner y R. T. Aplin, *Steroids*, 6, 1 (1965).
- 122) H. Audier, M. Fetizon y W. Vetter, *Bull. Soc. Chim. France*, 415 (1964).
- 123) E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl y W. Simon, "Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos", Ed. Alhambra, Madrid (1980), pág. 146.
- 124) N. S. Bhacca y D. H. Williams, "Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry", Holden-Day, Inc., San Francisco (1964), pág. 33.
- 125) F. A. Bovey, "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Academic Press, New York (1969), pág. 134.
- 126) J. N. Shoolery y K. T. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 5121 (1958).
- 127) T. Okamoto y K. Kawazoa, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 11, 643 (1963).
- 128)  $^{13}\text{C}$  Data Book, Bruker Physik (1976), pág. 943.

- 129) M. D. Gonzalez y G. Burton, *Org. Magnetic Resonance*, 22, 586 (1984).
- 130) G. Lukacs, X. Lusinchi, E. W. Hagaman, B. L. Buckwalter, F. M. Schell y E. Wenkert, *C. R. Acad. Sci. Ser. C.*, 274, 1458 (1972), mencionado en referencia 105.
- 131) J. N. Shoolery, *J. of Natural Products*, 47, 226 (1984).
- 132) D. H. Marr y J. B. Stothers, *Can. J. Chem.*, 43, 596 (1965).
- 133) W. G. Cole y D. H. Williams, *J. Chem. Soc.*, 1849 (1968).
- 134) J. K. Saunders, P. P. Easton y J. P. Schmit, resultados no publicados, mencionados por J. P. Schmit y G. G. Rousseau en referencia 17.
- 135) J. B. Lambert, R. J. Nienhuis y J. W. Keepers, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 20, 487 (1981).
- 136) H. Fujiwara, T. Takagi, M. Sugiura y Y. Sasaki, *J. Chem. Soc., Perkin trans. II*, 903 (1983).
- 137) K. L. Martin, J. J. Delpuech y G. J. Martin, "Practical NMR Spectroscopy", Heyden & Son Ltd., New York (1980), a) pág. 256.  
b) pág. 274.  
c) pág. 267.
- 138) M. Sass y D. Ziessow, *J. Magnetic Resonance*, 25, 263 (1977).
- 139) W. E. Smith, en "Annual Reports on NMR Spectroscopy". Vol. 13 (editado por G. A. Webb), Academic Press, New York (1978), pág. 206.
- 140) H. Campsteijn, L. Dupont, C. Dideberg y K. Mandel, *Acta Cryst.*, B29, 1726 (1973).
- 141) G. W. Snedecor, "Métodos de estadística; su aplicación a experimentos en agricultura y biología", Acme, Buenos Aires (1948). pág. 67.

- 142) L. Zyskkowski y A. Munck, Fed. Proc., 34, 329 (1975).
- 143) A. Munck y T. Brinck-Johnsen, J. Biol. Chem., 243, 5556 (1968).
- 144) K. M. Mosher, D. A. Young y A. Munck, J. Biol. Chem., 246, 654 (1971).
- 145) Y. Morita y A. Munck, Biochim. Biophys. Acta, 93, 150 (1964).
- 146) A. Munck, J. Biol. Chem., 243, 1039 (1968).
- 147) M. H. Mackman, E. Dvorkin y A. White, J. Biol. Chem., 243, 1485 (1968).
- 148) M. H. Mackman, S. Nakagawa y A. White, Recent Prog. Horm. Res., 23, 195 (1967).
- 149) T. D. Gelehrter y R. A. McDonald, Endocrinology, 109, 476 (1981).
- 150) S. J. Giddings y D. Young, J. Steroid Biochem., 5, 587 (1974).
- 151) N. Thomas y P. A. Bell, Molec. Cell Endocr., 22, 71 (1981).
- 152) D. Duval, S. Durant y F. Moro-Delarche, Biochim. Biophys. Acta, 732, 409 (1983).
- 153) E. T. Kellar, G. M. Landes y P. A. Kitos, Biochim. Biophys. Acta, 712, 223 (1982).
- 154) J. Stevens y T. W. Stevens, Cancer Research, 35, 2145 (1975).
- 155) M. B. Castillo y A. Roldán, comunicación personal.
- 156) A. Baldi, comunicación personal.
- 157) D. Gagne, F. Moro y D. Duval, Biochim. Biophys. Acta, 603, 27 (1980).
- 158) R. A. Demel y E. De Kruyff, Biochim. Biophys. Acta, 452, 109 (1976).
- 159) E. N. Willmer, Biol. Rev., 36, 363 (1961).
- 160) A. Khayat, P. Ketevi, L. Ter-Minassian-Saraga, M. Cittanova y H. F. Jayle, Biochim. Biophys. Acta, 401, 1 (1975).

- 161) P. Connor, Chem. Ind. (London), 378 (1981).
- 162) G. M. Shull y D. A. Kita, J. Am. Chem. Soc., 77, 763 (1955).
- 163) C. G. Salem y W. W. Zorbach, J. Am. Chem. Soc., 77, 1055 (1955).
- 164) T. Reichstein, Swiss 230,262. Mar. 1, 1944 (Chem. Abstr. 43: 3474e).
- 165) H. L. Herzog, C. C. Payne, M. T. Hughes, M. J. Gentles, E. B. Hershberg, A. Nobile, W. Charney, C. Federbush, D. Sutter, y P. L. Perlman, Tetrahedron, 18, 581 (1962).
- 166) R. L. Clarke, K. Dobriner, A. Mooradian y C. A. Martini, J. Am. Chem. Soc., 77, 661 (1955).
- 167) E. R. Pinson, Jr., E. Agnello y G. D. Laubach (to Chas. Pfizer & Co, Inc.), U.S. 3,033,873. Appl. May 11, 1960 (Chem. Abstr. 52:13844d).
- 168) A. Nobile, W. Charney, P.L. Perlman, H. L. Herzog, C. C. Payne, M. E. Tully, M. A. Jevnik y E. B. Hershberg, J. Am. Chem. Soc., 77, 4184 (1955).
- 169) Gedeon Richter Vegyeszeti Gyar R. T. (by G. Wix, G. Ambrus y K. Albrecht), Austrian 250,588 (Cl. C07c). Nov. 25, 1966 (Chem. Abstr. 66:36589d).
- 170) A. Wettstein, Helv. Chim. Acta, 23, 383 (1940).
- 171) G. Rosenkranz, J. Pataki y C. Djerassi, J. Org. Chem., 17, 290 (1952).
- 172) M. Uskokovic, R. I. Dorfman y M. Gut, J. Org. Chem., 23, 1947 (1958).
- 173) B. Berkoz, A. D. Cross, M. E. Adame, H. Carrio y A. Bowers, J. Org. Chem., 29, 1276 (1963).
- 174) F. Longevialle y R. Goutarel, Bull. Soc. Chim. France, 3225 (1965).

- 175) R. E. Marker y D. C. Lawson, J. Am. Chem. Soc., 61, 252 (1939).  
176) M. A. Dous y H. Hirschmann, J. Am. Chem. Soc., 75, 3240 (1953).